



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 15/13, 5/10, A61K 48/00, 35/14, A61P 31/12, 35/00 // C07K 16/28, 16/00	A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/24896 (43) Date de publication internationale: 4 mai 2000 (04.05.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02551 (22) Date de dépôt international: 20 octobre 1999 (20.10.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/13279 22 octobre 1998 (22.10.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ACRES, Bruno [CA/FR]; 10, rue Jean Hermann, F-67000 Strasbourg (FR). PAUL, Stéphane [FR/FR]; 7, rue du Vieux Marché aux Poissons, F-67000 Strasbourg (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regim- beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 3 août 2000 (03.08.00)
(54) Title: BIOLOGICAL MATERIAL FOR PREPARING PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR TREATING MAMMALS (54) Titre: MATERIEL BIOLOGIQUE POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES DESTINEES AU TRAITEMENT DE MAMMIFERES (57) Abstract The invention concerns a biological material for preparing pharmaceutical compositions for treating mammals, comprising: either a nucleic acid sequence containing at least a gene of therapeutic interest and elements expressing said gene <i>in vivo</i> in target cells genetically modified by one said nucleic sequence; or at least a target cell not producing antibodies naturally, genetically modified <i>in vitro</i> by at least one said nucleic acid sequence. The invention is characterised in that said gene of therapeutic interest codes for all or part of an antibody expressed at the surface of said target cell and said antibody is capable of fixing itself to a polypeptide present at the surface of a cytotoxic effector cell or a T lymphocyte helper and involved in the process activating such a cell. (57) Abrégé Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères comprenant: soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène <i>in vivo</i> dans des cellules cibles génétiquement modifiées par une dite séquence d'acide nucléique; soit au moins une cellule cible ne produisant pas naturellement des anticorps, génétiquement modifiée <i>in vitro</i> par au moins une séquence d'acide nucléique précédente, caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt thérapeutique code pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule cible et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

MATERIEL BIOLOGIQUE POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS
PHARMACEUTIQUES DESTINEES AU TRAITEMENT DE MAMMIFERES

La présente invention concerne le domaine de la thérapie
5 génique appliquée à l'immunothérapie spécifique, plus
particulièrement dans le cadre de traitements de maladies dont
l'agent responsable est un organisme pathogène, tel que
notamment un agent bactérien, parasitaire ou viral, ou dans le
cadre du traitement du cancer. Plus particulièrement,
10 l'invention concerne le transfert dans des cellules tumorales
ou infectées par un agent pathogène, de séquences d'acide
nucléique codant pour tout ou partie d'anticorps de sorte que
les cellules génétiquement modifiées par ces séquences d'acide
nucléique expriment à leur surface lesdits anticorps, et plus
15 particulièrement des anticorps capables de se fixer à un
polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice
cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le
procédé d'activation d'une telle cellule.

Depuis longtemps, la thérapie génique a été proposée pour
20 corriger les désordres observés dans le cadre des maladies
génétiques. Ces maladies s'expliquent en particulier par un
disfonctionnement de l'expression de gènes spécifiques ou par
l'expression de polypeptides mutés non fonctionnels dans au
moins un type cellulaire. La thérapie génique consiste dans ce
25 cas à transférer dans des cellules cibles spécifiques extraites
puis réintroduites dans le corps humain, ou directement dans les
organes affectés, l'information génétique capable de corriger
le défaut observé. Il pourra s'agir par exemple du gène codant
pour la protéine CFTR dans le cas de la mucoviscidose ou du gène
30 codant pour la dystrophine dans le cas de la myopathie de
Duchenne. Dans le cadre de cette approche, l'information
génétique est introduite soit *in vitro* dans une cellule extraite
de l'organe, la cellule modifiée étant ensuite réintroduite dans
l'organisme (procédé *ex vivo*), soit directement *in vivo* dans le
35 tissu approprié. De nombreuses publications décrivent la mise
en oeuvre de protocoles de thérapie génique afin d'obtenir dans
les cellules cibles l'expression d'une protéine présentant un

intérêt thérapeutique par introduction de l'information génétique correspondante.

Toutefois, l'intérêt de ce type de thérapie ne se borne pas au traitement des affections purement génétiques et peut également permettre l'élimination de tumeurs, ou d'agents pathogènes, tels que les agents bactériens ou viraux, ou de cellules infectées par de tels agents pathogènes, ou à défaut de retarder leur progression.

La réponse immune dirigée contre un antigène spécifique peut être divisée en deux catégories distinctes, l'une mettant en jeu les anticorps (réponse immune de type humoral), l'autre les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques (CTL) ou les cellules tueuses (NK) ainsi que les lymphocytes T helper, notamment les LTCD4 (réponse immune de type cellulaire). Plus particulièrement, les deux types de réponses se distinguent en ce que les anticorps reconnaissent les antigènes sous leur forme tridimensionnelle alors que les lymphocytes T, par exemple, reconnaissent des portions peptidiques desdits antigènes, associés à des glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (ou CMH), notamment les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules ou les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type II qui sont exprimés de façon spécifique à la surface des cellules impliquées dans la présentation des antigènes (APC).

Selon un premier aspect, la réponse immune de type cellulaire est caractérisée en ce que les cellules T de type CD4+ (cellules T «helper»), suite à un phénomène d'activation bien connu (pour une revue voir Alberola-Ila, 1997, Annu. Rev. Immunol., 15, 125-154) produisent des cytokines qui à leur tour induisent la prolifération de cellules APC capables de produire lesdites cytokines ; la différenciation cellulaire des lymphocytes B capables de produire des anticorps spécifiques ; et la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Selon un second aspect de la réponse immune cellulaire, les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les lymphocytes

de type CD8+ (CTL) sont activés a) après interaction avec des peptides antigéniques fixés sur et présentés par les glycoprotéines portées par les cellules ubiquitaires et codées par les gènes appartenant au système CMH I, et b) éventuellement
5 par les cytokines produites par les CD4+. Les CTL ainsi activés sont alors capables de détruire les cellules exprimant ledit peptide antigénique.

Dans le cas particulier des cancers, Hellstrom et al., (1969, Adv. Cancer Res. 12, 167-223) ont montré que la défense
10 de l'organisme à l'égard des tumeurs repose tout particulièrement sur la réponse immunitaire mettant en jeu les lymphocytes T, notamment les lymphocytes T cytotoxiques. Toutefois, de nombreux travaux ont montré que la plupart de ces effecteurs immunitaires, spécifiques ou non, sont inefficaces
15 pour permettre l'élimination ou l'arrêt de progression d'une tumeur. C'est la raison pour laquelle il est souhaitable de disposer d'une méthode de stimulation de la réponse immune dirigée contre les tumeurs, et plus particulièrement de la réponse faisant intervenir les lymphocytes cytotoxiques CTL,
20 afin de disposer de méthodes de prévention ou de traitement des états cancéreux plus efficaces. De manière identique, il a été montré que le système immunitaire est souvent inefficace dans le cas d'infections, virales notamment, voir par exemple le cas des infections dues au VIH (Virus de l'Immunodéficience
25 Humaine).

Selon une première alternative, il a été proposé d'adapter les procédés de thérapie génique déjà bien connus et de transférer dans les cellules cibles, plus particulièrement les cellules cancéreuses, des gènes immunostimulateurs
30 (immunothérapie) susceptibles d'induire ou d'activer une réponse immune à médiation cellulaire à l'égard de la tumeur, de gènes codant pour les cytokines (Colombo et al., 1994, Immunology Today, 15, 48-51), de gènes cytotoxiques conférant une toxicité aux cellules les exprimant, par exemple le gène tk du virus
35 Herpes Simplex de type 1 (HSV-1), ou d'anti-oncogènes, tels que par exemple le gène associé au rétinoblastome ou p53, ou de polynucléotides capables d'inhiber l'activité d'un oncogène, tels que par exemple les molécules antisens ou les ribozymes

capables de dégrader les ARN messagers spécifiques des oncogènes. Cependant, dans la majorité des cas, les cellules ainsi modifiées manquent de spécificité vis-à-vis de la tumeur et ne permettent pas une approche thérapeutique satisfaisante.

5 Une autre approche a également été proposée alliant les avantages de la thérapie génique et la mise en oeuvre d'anticorps spécifiques. Au cours des dernières années de nombreux antigènes tumoraux ont été caractérisés qui ont plus particulièrement permis l'identification d'anticorps, notamment
10 d'anticorps monoclonaux spécifiques de ces antigènes. Par ailleurs, la production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps tels que les anticorps chimères, par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023). Ainsi, de nombreuses
15 stratégies thérapeutiques ont été proposées, par exemple pour le traitement ou la prévention de lymphomes B (Yefenof et al., 1993, Current Opinion in Immunology, 5, 740-744), reposant sur l'administration au patient d'anticorps thérapeutiques ciblant des antigènes tumoraux afin de neutraliser l'agent causal de la
20 maladie. Malheureusement, ces anticorps bien que très utiles pour la détection et le diagnostic des cancers se sont révélés non satisfaisants d'un point de vue thérapeutique car ils conduisent, par exemple, à des réactions immunes limitées, dirigées uniquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou
25 contre des antigènes présentant une grande variabilité.

La demande de brevet internationale (WO 94/29446) décrit l'expression intracellulaire de séquences d'ADN codant pour des anticorps. Cette approche permet d'envisager une thérapie génique reposant sur le ciblage de composants cellulaires non
30 accessibles par les méthodes de vaccination et se caractérise en ce que l'approche décrite n'implique pas le développement d'une réponse immunitaire, agit intracellulairement et par conséquent ne permet pas le traitement efficace de tumeurs.

La demande de brevet internationale (WO 98/31808)
35 concerne au contraire l'expression *in vivo* de gènes codant pour des anticorps ou des fragments d'anticorps par des cellules capables de sécréter lesdits anticorps dans la circulation

sanguine du mammifère porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène codant pour l'anticorps. L'avantage de cette invention repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un niveau basal d'anticorps dans le patient traité.

5 Nous avons maintenant montré qu'il est possible de rediriger la réponse immunitaire cellulaire en exprimant à la surface de cellules cibles, notamment tumorales ou infectées par un agent pathogène, tout ou partie d'un anticorps capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface de cellules
10 effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper. Plus particulièrement, nous avons montré que selon la présente invention, ces cellules cibles génétiquement modifiées permettent de diriger l'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper, d'augmenter l'effet
15 cytotoxique de ces cellules, notamment activées, à l'égard des cellules cibles, de dynamiser la réponse immune à médiation cellulaire se produisant naturellement à l'égard des cellules tumorales ou infectées, génétiquement modifiées ou non. Ceci peut ainsi se traduire par la lyse et l'élimination desdites
20 cellules cibles, des cellules voisines et à terme par l'élimination de la tumeur ou de l'infection.

La présente invention concerne en premier lieu un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères
25 comprenant :

- soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par
30 ladite séquence d'acide nucléique ;

- soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement des anticorps et génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique précédente,

caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt thérapeutique
35 code pour tout ou partie d'un anticorps qui sera exprimé à la surface de ladite cellule de mammifère et en ce que ledit

anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

- 5 Par «séquence d'acide nucléique», on entend désigner un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel isolé ou de synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique sans
10 limitation de taille. Selon un mode de réalisation préféré, il s'agit d'un acide nucléique choisi parmi le groupe consistant en un cADN ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messenger.

- Selon l'invention, ladite «séquence d'acide nucléique»
15 comprend au moins un «gène d'intérêt thérapeutique» et des éléments d'expression dudit gène d'intérêt. Un tel «gène d'intérêt thérapeutique» code notamment pour tout ou partie d'un anticorps transmembranaire natif, ou pour un dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé
20 d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible de mammifère génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.
25 Plus particulièrement, par «fragment» d'anticorps on entend désigner les fragments F(ab)₂, Fab', Fab, sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology, 159, 5821-5833 ; Bird et al., 1988, Science, 242, 423-426) d'un anticorps natif et par «dérivé» par exemple un dérivé chimérique d'un tel anticorps
30 (voir par exemple les chimères les anticorps anti CD3 Souris/Homme dans Arakawa et al., 1996, J. Biochem., 120, 657-662 ou les immunotoxines telles que sFv-toxine de Chaudary et al., 1989, Nature 339, 394-397). Par «anticorps transmembranaire» on entend désigner un anticorps dont au moins la
35 région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention

consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'amino acides (polypeptide transmembranaire) permettant l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature. Selon un cas préféré de l'invention, ledit polypeptide transmembranaire est sélectionné parmi le groupe consistant en une glycoprotéine, une lipoprotéine, en un récepteur tel que tout ou partie des complexes évoqués plus loin dans la demande (CD4, Fc, gp160 du VIH par exemple), et plus particulièrement parmi le groupe consistant en la glycoprotéine du virus de la rage (demande de brevet français n° FR 97 09152), le CD4 (Weijtens et al., 1998, Gene Therapy, 5, 1195-1203), la gp160, le Fc. Selon un cas tout à fait avantageux, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps sera fusionnée avec la séquence d'acide nucléique codant pour undit polypeptide transmembranaire.

Par «éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo*», on entend désigner les éléments nécessaires afin d'assurer l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine, pour le surfactant pulmonaire. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices. Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences,

identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou en sens inverse, pour
5 autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée. De même, dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques «neutres» ou introns qui ne nuisent pas la transcription et sont épissées avant l'étape
10 de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (WO 94/29471). Ledit acide nucléique pourra également renfermer des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la réplication et/ou pour l'intégration, pour la transcription ou la traduction. De telles
15 séquences sont bien connues de l'homme de l'art. Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide
20 d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la séquence d'acide nucléique est une séquence d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction
25 dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acide nucléique peut être sous la forme d'un vecteur, et plus particulièrement sous la forme d'un
30 vecteur viral tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non-viral tel que par exemple un vecteur consistant en au moins une dite séquence d'acide nucléique complexée ou
35 conjuguée à au moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire protique notamment

choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L -2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés.

Par ailleurs, de tels vecteurs peuvent en outre comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers (cellules tumorales, cellules de l'épithélium pulmonaire, cellule hématopoïétique, cellule musculaire, cellule nerveuse...). Ils peuvent également permettre de diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tels que le noyau et les mitochondries, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse des endosomes. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogéniques, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une combinaison de tels composés. En particulier, il peut s'agir de résidus galactosyl permettant de cibler le récepteur des asialoglycoprotéines à la surface des cellules hépatiques, de ligands pouvant interagir avec des récepteurs tels que des récepteurs de facteurs de croissance, des récepteur de cytokines, de lectines, de protéines d'adhésion, il peut également s'agir d'un fragment d'anticorps tel que le fragment Fab, d'un peptide fusogénique INF-7 dérivé de la sous unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus influenza (Plank et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924), d'un signal de localisation nucléaire dérivé de l'antigène T du virus SV40 ou de la protéine EBNA-1 du virus Epstein Barr.

Selon l'invention, l'anticorps exprimé à la surface des cellules cibles est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, notamment un lymphocyte T helper CD4, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, et plus particulièrement à un récepteur directement impliqué dans un tel procédé. Comme cela est décrit précédemment, ce phénomène d'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper est un élément déterminant de la réaction immunitaire à médiation cellulaire. Toutefois, il convient de remarquer que dans le cadre de la mise en oeuvre de la présente invention, il n'est pas indispensable que le procédé d'activation ait lieu après la fixation par l'anticorps exprimé selon l'invention à la surface des cellules cibles. En effet, conformément à l'invention, cet anticorps peut également se lier aux peptides tels que définis mais présents sur des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes helper déjà activés. Par «cellules effectrices cytotoxiques» on entend désigner les macrophages, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) et les cellules tueuses (NK), ainsi que leurs cellules dérivées telles que par exemple les LAK, (²Versteeg, 1992, Immunology Today, 13, 244-247 ; Brittende et al., 1996, Cancer 77, 1226-1243 ; Poplack et al., 1976, Blood 48, 809-816). Par «lymphocytes T helper», on entend désigner notamment les CD4 qui permettent après activation la sécrétion de facteurs d'activation des cellules effectrices de la réponse immune (voir plus avant). Les polypeptides, et notamment les récepteurs, exprimés à la surface de ces cellules et qui sont impliqués dans l'activation de telles cellules consistent notamment en tout ou partie du complexe TCR, plus particulièrement le TCR- α , le TCR- β ou le CD3, tout ou partie des complexes CD8, CD4, CD28, LFA-1, 4-1BB (Melero et al., 1998, Eur. J. Immunol., 28, 1116-1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30, CD40, tout ou partie des récepteurs de cytokines (Finke et al., 1998, Gene Therapy, 5, 31-39), telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, tout ou partie du complexe récepteur des cellules NK tel que par exemple V α 14NKT (Kawano et al., 1998, Immunology, 95, 5690-5693), NKAR, Nkp46 (Pessino et al., 1998, J. Exp. Med., 188, 953-960), Nkp44, tout ou partie des récepteurs de macrophages tels que par exemple le

récepteur Fc (Deo et al., 1997, Immunology Today, 18, 127-135). Selon un mode de réalisation particulier, il est également possible d'envisager de modifier génétiquement, notamment *in vivo*, les cellules effectrices cytotoxiques ou les lymphocytes T helper de façon à ce qu'elles expriment à leur surface un polypeptide, naturellement non exprimé par ces cellules, et capable d'induire le procédé d'activation de telles cellules, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide.

5 T helper de façon à ce qu'elles expriment à leur surface un polypeptide, naturellement non exprimé par ces cellules, et capable d'induire le procédé d'activation de telles cellules, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide.

10 Conformément à la présente invention, il est alors possible de sélectionner une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps susceptible d'être exprimé à la surface des cellules cibles du patient à traiter, ledit anticorps étant capable de

15 se fixer à un tel polypeptide naturellement non exprimé par ces cellules effectrices cytotoxiques ou lymphocytes T helper.

Plus particulièrement, la présente invention repose sur la possibilité de cloner les gènes codant pour tout ou partie d'un anticorps et d'exprimer ledit anticorps dans des cellules après transfert desdits gènes dans lesdites cellules à partir des vecteurs tels que décrits précédemment. La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour des anticorps capables de réagir avec de tels polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les

20 après transfert desdits gènes dans lesdites cellules à partir des vecteurs tels que décrits précédemment. La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour des anticorps capables de réagir avec de tels polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les

25 séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps. Citons pour exemple les gènes codant pour les chaînes légère et lourde de l'anticorps YTH 12.5 (anti CD3) (Routledge et al., 1991, Eur. J. Immuno. 21, 2717-2725), de l'anti CD3 selon Arakawa et al., 1996, J. Biochem., 120, 657-662). Les séquences

30 d'acide nucléique de tels anticorps sont aisément identifiables à partir des bases de données communément utilisées par l'homme du métier.

Il est également possible, à partir d'hybridomes disponibles auprès de l'ATCC et qui sécrètent des anticorps

35 spécifiques de polypeptides présents à la surface de cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper et impliqués dans le procédé d'activation de telles cellules (par exemple un hybridome excrétant des immunoglobulines Gy2b+k dirigées contre

les récepteurs du TCR), de cloner les séquences d'acides nucléiques codant pour les chaînes lourdes et/ou légères de ces différents anticorps par les méthodes d'amplification telles que la RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou les techniques mettant en oeuvre des banques de cADN (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning. A laboratory manual. C.S.H. Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Les séquences ainsi clonées sont alors disponibles pour leur clonage dans des vecteurs. Selon un cas préféré de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée par recombinaison homologue avec la séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide transmembranaire tel que la glycoprotéine rabique. (ces techniques de biologie moléculaires sont parfaitement décrites dans la demande de brevet français n° FR 97 09152) ou la gp160 (Polydefkis et al., 1990, J. Exp. Med., 171, 875-887).

Parmi les cellules cibles de mammifère que l'invention se propose d'éliminer ou de limiter dans leur progression, on peut citer plus spécifiquement les cellules tumorales, les cellules infectées par un agent pathogène viral ou les cellules infectées par un agent pathogène bactérien. Selon l'invention, l'expression à la surface de ces cellules de tout ou partie d'un anticorps capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, permet de diriger la réponse immune cytotoxique vers une cible donnée, et plus particulièrement de diriger cette réponse au niveau d'une tumeur ou d'un foyer infectieux.

A titre d'«agent pathogène viral» on peut par exemple citer le virus VIH, EBV, CMV, le virus de l'hépatite et les papillomavirus. Par «agent pathogène parasitaire», on peut par exemple citer *Leishmania leishmaniae* et *Plasmodium falciparum*.

Selon un mode de réalisation particulier, l'invention concerne un matériel biologique constitué par au moins une cellule cible, telle que notamment une cellule tumorale ou une cellule infectée par un agent pathogène viral, ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur

administration dans l'organisme d'un mammifère, humain ou animal, ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, ladite cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule cible, et ledit anticorps étant capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper tel que ceux précédemment décrits. Plus particulièrement, ladite cellule cible provient soit du mammifère à traiter, soit d'un autre mammifère que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule cible aura subi un traitement la rendant compatible avec le mammifère à traiter. Selon un cas préféré, par «mammifère» on entend désigner un mammifère humain.

Un tel matériel biologique, lorsqu'il est administré à un patient, et plus particulièrement administré par voie intratumorale, est capable d'induire chez celui-ci une réponse immunitaire à médiation cellulaire pouvant conduire à la production de cytokines et à l'effet cytotoxique des cellules effectrices qui se traduisent non seulement par l'élimination des cellules administrées mais également à l'élimination des cellules voisines présentant les antigènes, notamment tumoraux, susceptibles d'être reconnus par lesdites cellules effectrices cytotoxiques activées.

L'invention concerne par ailleurs l'utilisation d'un matériel biologique tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention de cancers ou d'infections virales. Plus particulièrement, l'invention porte sur l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles génétiquement modifiées par une dite séquence d'acide nucléique, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule cible et capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, pour la préparation

de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène.

Pour la mise en oeuvre du traitement du mammifère mentionné dans la présente invention, il est possible de
5 disposer de compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que précédemment décrit, avantageusement associé avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour l'administration à l'homme ou à l'animal. L'utilisation de tels supports est décrite dans la littérature. Ce véhicule
10 pharmaceutiquement acceptable est préférentiellement isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse, tel que par exemple une solution de sucrose. Par ailleurs, ladite composition peut contenir des solvants, des véhicules aqueux ou partiellement aqueux tels que
15 de l'eau stérile, libre d'agent pyrogène et des milieux de dispersion par exemple. Le pH de ces compositions pharmaceutiques est convenablement ajusté et tamponné selon les techniques conventionnelles.

Selon une variante, l'invention concerne une composition
20 pharmaceutique comprenant notamment un matériel biologique comme décrit et un composé protéique naturellement responsable de ou impliqué dans l'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper. Plus particulièrement, un tel composé consistera en une cytokine (The cytokine Handbook, 2eme
25 Ed., Ed. A. W. Thomson, Ac. Press, Harcourt Brace&Company), une chemokine (Rollins et al, 1997, Blood, 90, 909-928 ; Devalaraja et al, 1999, TIPS, 20, 151-156) ou tout autre composé permettant la co-stimulation des cellules effectrices cytotoxiques (par exemple tout ou partie d'un anticorps anti-CD28 ; Stefan et al,
30 1997, Cancer research, 59(8), 1961-1967). De façon préférée, ledit composé sera l'IL2. Dans une variante de mise en œuvre, le matériel biologique selon la présente invention pourra comporter, en outre, une séquence d'ADN assurant l'expression d'un composé impliqué dans l'activation des cellules effectrices
35 cytotoxiques ou de lymphocytes T helper. Dans ce cas, cette séquence peut être contenue dans la séquence d'acide nucléique précédemment décrite ou contenue dans une séquence d'acide nucléique indépendante de celle contenant ledit gène d'intérêt

thérapeutique (WO 95/09241).

Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* ou par une approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules cibles au mammifère à traiter, à les transfecter *in vitro* selon l'invention et à les réadministrer audit mammifère.

Le matériel biologique selon l'invention peut être administré *in vivo* notamment sous forme injectable, notamment par voie intratumorale. On peut également envisager une injection par voie intratrachéale, intranasale, épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intrapleurale, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent. Selon un autre mode de réalisation, on peut utiliser des systèmes adaptés au traitement des voies aériennes ou des muqueuses tels que l'inhalation, l'instillation, ou l'aérosolisation, par voie topique, par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, ou encore de l'acide nucléique à transférer ou de l'organe/tissus cible.

L'invention concerne également une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule décrit plus haut.

Enfin, l'invention concerne un procédé de préparation d'une cellule telle que décrite ci-dessus caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique.

Les exemples ci-après illustrent l'invention sans la limiter en aucune façon.

Légende des Figures :

Figure 1 : Test de prolifération sur splénocytes murins (2E5 cellules/puits) activés avec des cellules P815 armées avec les anticorps TR310 et H57-597. Mise en présence pendant 5 jours. Marquage thymidine tritiée 8h. Les résultats sont exprimés en quantité de thymidine tritiée incorporée (10E3 cpm).

Figure 2 : Analyse par cytométrie de flux de l'expression des différents anticorps après infection de cellules BHK21 avec les différents virus recombinants. A-B-C correspondent aux infections réalisées avec les virus MVATG14205, MVATG14240 et MVATG14237, respectivement. (T : marquage négatif à l'aide d'un anticorps témoin négatif ; m anti-rat IgG : marquage à l'aide d'un anticorps de souris dirigé contre les IgG de rat ; r anti-hamster IgG : marquage à l'aide d'un anticorps de rat dirigé contre les IgG de hamster).

Figure 2A : Analyse de l'expression de l'anticorps TR310

Figure 2B : Analyse de l'expression de l'anticorps KT3

Figure 2C : Analyse de l'expression de l'anticorps H57-597.

- Figure 3 : Modèle P815 (faible immunogénécité ; H2d ; CMH1 ; ICAM1 ; CD48). Test de prolifération sur splénocytes murins (2.10^5 cellules/ puits) activés avec des cellules P815 infectées avec les différents virus MVA recombinants. A-B correspond à la mise en contact de 2.10^5 splénocytes avec 20000 ou 2000 des différentes cellules P815 respectivement. P815/TR310 , P815/H57-597 et P815/R2 : P815 armées avec les anticorps TR310, H57-597 et un anticorps témoin, respectivement ; P815/MVATG14205, P815/MVATG14237, P815/MVATG14240 : P815 infectées avec les différents virus MVA recombinants ; Con A et IL-2 : témoins positifs correspondant à la stimulation de splénocytes avec de la concanavaline A ou de l'interleukine-2 recombinante ; cellules : splénocytes seuls. Le pourcentage d'infection avec les différents virus MVA recombinants est indiqué.
- Figure 4 : Modèle B16F0 (non immunogène ; H2b) test de prolifération sur splénocytes murins (2.10^5 cellules/ puits) activés avec des cellules B16F0 infectées avec les différents virus MVA recombinants. A-B-C correspond à la mise en contact de 2.10^5 splénocytes avec 20000 , 10000 ou 2000 des différentes cellules B16F0. B16F0/MVATG14205, B16F0/MVATG14237, B16F0/MVATG14240 : B16F0 infectées avec les différents virus MVA recombinants ; Con A: témoin positif correspondant à la stimulation de splénocytes avec de la concanavaline A; cellules : splénocytes seuls. Le pourcentage d'infection avec les différents virus MVA recombinants est indiqué.

Exemple 1

1 - Méthodes:

1-1 Construction des virus MVA recombinants

Afin de permettre le clonage des séquences d'acide nucléique codant pour différents anticorps choisis pour leur capacité à activer les lymphocytes T, trois hybridomes différents ont été sélectionnés :

- hybridome TR310 (rat anti-Vb7 murin (IgG2b); ATCC HB-219; I. L.Weissman;fusion myelomes murin/splénocytes rat).
- hybridome H57-597 (hamster anti-TCRab murin (IgG); ATCC HB-218; Kubo et al, 1989, J. Immunology, 142: 2736-2742; fusion

myelomes murin/splénocytes hamster).

- hybridome KT3 (rat anti-CD3e murin (IgG2a); Tomonari *et al*, 1988, Immunogenetics, 28: 455-458; fusion myelomes murin/splénocytes rat).

5 Le clonage des séquences codant pour l'intégralité des différentes chaînes lourdes et légères de ces anticorps a été réalisé selon deux méthodes différentes à partir des ARN totaux extraits des 3 hybridomes:

a) par RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques (10 Bca BEST™ RNA PCRKit, Takara Shuzo Co., Ltd; Frohman *et al*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8998-9002) définis de manière à ce qu'ils s'hybrident au niveau des régions conservées des séquences 3' constante et 5' variable codant pour les immunoglobulines correspondantes (voir C. A. Kettleborough *et al*, 15 *al*, 1993, Eur. J. Immunol. 23: 206-211). Plus particulièrement, ces séquences ont été définies à l'aide des informations suivantes disponibles sur GeneBank :

Hybridome TR310 et KT3 (chaînes lourdes et légères de rat):

20 -chaîne lourde de type gamma: Rat anti-acetylcholine receptor antibody gene, rearranged Ig gamma-2a chain, VDJC region, complete cds. Author: Agius, M. A. and Bharati, S. 1993. Numero d'accession dans genbank=L22654

25 -chaîne légère de type kappa: Rat anti-acetylcholine receptor antibody gene, kappa-chain, VJC region, complete cds. Author: Agius, M. A. and Bharati, S. 1993. Unpublished. Numéro d'accession dans genbank=L22653.

Hybridome H57-597: (chaîne lourde et légère de hamster):

30 -chaîne lourde de type gamma: Cricetulus migratorius IgG heavy chain mRNA, complete cds. Author: Whitters, M. J. and Collins, M. 1995. Immunogenetics. 42(3): 227-228. Numéro d'accession dans genbank=U17166.

-chaîne légère de type lambda: Mus Musculus immunoglobulin lambda chain (IgL) mRNA, complete cds. Author:

Reidl, L. S. Kinoshita, C. M. and Steiner, L. A. 1992. J. Immunol. 149: 471-480. Numero d'accession dans genbank=M94349.

b) par constructions de banques de cDNA en pBluescript (Universal Riboclone System, Promega, Madison, USA; Maniatis et al, 1982, Molecular cloning. A laboratory manual. C. S. H. Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) et screening de ces banques avec les fragments amplifiés selon a).

Les chaînes ainsi isolées sont sous-clonées par recombinaison dans un virus MVA recombinant renfermant la séquence d'acide nucléique codant pour la région transmembranaire du virus de la rage (Modified Vaccinia Ankara; Antoine et al, 1998, Virology, 244: 365-396 et demande de brevet français n° FR 97 09152) afin d'obtenir des virus recombinants capables d'exprimer des anticorps fonctionnels capables de reconnaître et de se lier à leur antigène spécifique et exprimés de manière transmembranaire à la surface des cellules recombinées.

1-2 Etude *in vitro* de l'effet des anticorps TR310 et H57-597 sur la prolifération de splénocytes murins.

Des splénocytes murins (souche DBA/2) ont été stimulés avec des cellules tumorales murines P815HT (souche C57/Bl6; Acres et al, 1993, J. Immunother. 14: 136-143) en présence de l'un ou l'autre des deux anticorps (TR310 et H57-597) purifiés à partir des surnageants d'hybridome correspondant, pendant 1h à 37°C. La présence à la surface des cellules P815HT de récepteurs à immunoglobulines de type Fc permet le recouvrement desdites cellules avec les anticorps. Après 5 jours d'incubation entre les cellules P815 présentant à leur surface les anticorps sélectionnés et les splénocytes, la prolifération des lymphocytes T est mesurée par un test d'incorporation de thymidine tritiée (Gimmi et al, 1996, Nat. Med. 12: 1367-1371).

Par ailleurs, lors de cette étude, plusieurs paramètres ont été analysés:

a) nombre de cellules P815 présentant à leur surface les

anticorps sélectionnés nécessaire à la stimulation ;

b) co-stimulation éventuelle à l'aide d'IL-2 recombinante humaine au jour 4 (100 ng/ml soit 50 UI/ml; R&Dsystems)

1-3 Etude de la réponse Th (T helper) associée à la stimulation
5 des splénocytes par les différents anticorps (TR310 et H57-597)
présentés à la surface des cellules P815.

Pour évaluer cette réponse, les surnageants du test de prolifération précédent, réalisé en présence d'IL-2 recombinante humaine, ont été prélevés au jour 4 ou 5. La présence dans ces
10 surnageants d'IL-4 (réponse de type Th2) ou d'IFN γ (réponse de type Th1) a été mesuré à l'aide de kits spécifiques disponibles dans le commerce, selon les recommandations du fournisseur (Kit Quantikine, R&D systems).

15 2 - Résultats

2-1 Etude *in vitro* de l'effet des anticorps TR310 et H57-597 sur la prolifération de splénocytes murins.

20 2 - 1 - 1 - Contrôles

Parallèlement à cette étude, un certain nombre de témoins ont également été analysés.

Il s'agit plus particulièrement de mesurer les effets observés dans des conditions identiques au test proprement dit
25 de :

RPMI CT: témoin négatif renfermant le milieu seul.

Spléno: témoin négatif renfermant les cellules splénocytes seules.

Spléno + P815 +/- IL-2: témoin négatif renfermant les
30 cellules splénocytes + les cellules P815 cibles non armées, en présence ou en absence (+/-) d'IL-2 (100 ng/ml) ajoutée au jour 4.

Spléno + P815/R2 +/- IL-2: témoin négatif renfermant les
35 cellules splénocytes + les cellules P815 cibles portant à leur surface un anticorps neutre (non capable d'induire l'activation des lymphocytes) +/- IL-2 (100 ng/ml) ajoutée au jour 4.

Spléno + ConA: témoin positif correspondant à la stimulation des splénocytes murins à l'aide de la Concanavaline

A (10 µg/ml) qui est un mitogène murin puissant.

Spléno + PHA-P: témoin positif correspondant à la stimulation des splénocytes murins à l'aide de la phytohématogluttinine A (1 µg/ml) qui est un mitogène humain
5 puissant.

2 - 1 - 2 - Test

P815/TR310 (20000/2000/200)+/-IL-2: Evaluation de la stimulation de splénocytes murins par des cellules P815 cibles
10 portant à leur surface un anticorps TR310 (2E4, 2E3, 2E2 cellules/test) en présence ou non d'IL-2 recombinante humaine à partir de J+4.

P815/H57-597 (20000/2000/200)+/-IL-2: Evaluation de la
15 stimulation de splénocytes murins par des cellules P815 cibles portant à leur surface un anticorps H57-597 (2E4, 2E3, 2E2 cellules/test) en présence ou non d'IL-2 recombinante humaine à partir de J+4.

20 Les résultats de stimulation obtenus sont présentés sur la Figure 1. Ces résultats montrent que la présentation d'anticorps «activateurs» de lymphocytes T à la surface des cellules cibles P815 permet l'activation et la prolifération de splénocytes murins (visualisées par l'incorporation de thymidine
25 tritiée). L'ajout d'interleukine-2 recombinante humaine ne semble pas amplifier cette stimulation anticorps-dépendante. Par ailleurs, nous avons également montré que l'activation des lymphocytes telle que mesurée s'accompagne de la lyse des cellules cibles P815.

30

2-2 Etude de la réponse Th (T helper) associée à la stimulation des splénocytes par les différents anticorps (TR310 et H57-597).

Les résultats observés sont présentés sur le Tableau 1 suivant qui indique les mesures des dosages de l'IL-4 et de
35 l'IFN γ après activation de splénocytes murins par les anticorps TR310 et H57-597 présents à la surface de cellules tumorales murines P815.

cellules activatrices	P815 2000 cellules/test	P815-TR310 2000 cellules/test	P815-H57-597 2000 cellules/test
dosage de l'IL-4 produite en pg/ml	0	31	23.5
dosage de l'IFNg produite en pg/ml	0	92.9	162.75

Ces dosages montrent que les anticorps TR310 et H57-597 dans un contexte de présentation membranaire induisent les 2 types de réponse Th1 et Th2 (tableau 1). Les anticorps TR310 et H57-597 sont donc capables lorsqu'ils sont présentés à la surface de cellules tumorales d'activer une réponse de type «helper» Th1 mais aussi Th2 en se liant à leur récepteur membranaire présent à la surface des cellules T CD4+. La sécrétion de ces cytokines permet en particulier d'augmenter la réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales.

Exemple 2

1- Méthodes :

1-1 Construction des virus MVA recombinants

Trois virus MVA recombinants ont été construits (MVATG14205 exprimant l'anticorps de rat TR310 (anti-V beta 7 murin) ; MVATG14237 exprimant l'anticorps de hamster H57-597 (anti-TCR alpha/beta de hamster) et MVATG14240 exprimant l'anticorps de rat KT3 (anti-CD3 epsilon de rat). Les cassettes d'expression ont été introduites dans la délétion II du MVA (Modified Virus Ankara) comme décrit dans la demande de brevet WO 9903885. La chaîne légère de chaque anticorps a été placée sous contrôle du promoteur vaccine early-late p7.5 (Goebel et al, 1990, Virology, 179, 247-266). La séquence codant pour la chaîne lourde de chaque anticorps a été placée sous le contrôle

du promoteur vaccine early-late pH5R (Goebel et al, 1990, Virology, 179, 247-266). Afin de faciliter la sélection des virus MVA recombinants, le gène de sélection GPT (xanthine-guanine phosphoribosyltransférase) de E. coli est utilisé.

- 5 L'extrémité C-terminale de la chaîne lourde de chaque anticorps est en outre fusionnée avec le domaine trans-membranaire et intra-cytoplasmique de la glycoprotéine rabique afin de permettre l'ancrage des anticorps dans la membrane plasmique.

- 10 1-2 Evaluation de l'expression des différents anticorps après infection de cellules embryonnaires de poulet (CEP) avec les différents virus MVA recombinants.

- L'expression est analysée par Western Blot en respectant les conditions du kit «ECL™ Western Blotting » d'Amersham Life Science (UK). Pour cela, des cellules embryonnaires de poulet
15 sont infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 avec les différents virus MVA recombinants. Les mêmes cellules sont également infectées avec le virus contrôle MVAN33. Après 24h d'infection, les cellules sont lavées avec du PBS puis soumises
20 à sonication dans le tampon de dépôt. La suspension est ensuite dénaturée 3 min à 95°C avant d'être fractionnée sur un gel de polyacrylamide 13%. Les protéines ainsi fractionnées sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (porablot ; Macherey-Nagel). L'expression des anticorps TR310 et KT3 est analysée
25 après hybridation à l'aide d'un anticorps de souris dirigé contre les IgG de rat couplé à la HRPO (horseradish peroxidase ; 10 µg/ml). L'expression de l'anticorps H57-597 est analysée après hybridation à l'aide d'un anticorps de rat dirigé contre les IgG de hamster couplé à la HRPO.

30

- 1-3 Analyse par cytométrie de flux de l'expression des différents anticorps après infection de cellules BHK21 avec les différents virus recombinants.

- L'expression est analysée par FACS après infection de
35 cellules BHK21 (Baby Hamster Kidney) à une MOI de 1 avec les différents virus MVA recombinants. Après 12 h d'infection, les cellules sont décollées puis analysées. La détection des anticorps TR310 et KT3 est réalisée après incubation avec un

anticorps de souris dirigé contre les IgG de rat, couplé à la FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc (Pennsylvania ; USA)). La détection de l'anticorps H57-597 est réalisée à l'aide d'un anticorps de rat dirigé contre les IgG de hamster couplé à la FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc (Pennsylvania ; USA)). Les cellules infectées ont également été incubées avec un anticorps témoin.

1-4 Etude *in vitro* de la fonctionnalité des différents virus MVA recombinants.

La fonctionnalité des virus MVA recombinants est testée en réalisant des test de prolifération sur splénocytes murins. Des splénocytes murins (souche DBA/2) sont stimulés avec des cellules tumorales murines P815HT ou B16F0 infectées avec les 3 virus MVA recombinants. Pour cela, des cellules P815HT et B16F0 sont infectées à une MOI de 1 pendant 20h avec les virus MVATG14205, MVATG14237, MVATG14240 et MVAN33 (contrôle négatif). Pour le modèle P815HT, les cellules sont également mises en contact avec 10 µg/ml des anticorps TR310 et H57-597 purifiés à partir de surnageant d'hybridome. Les cellules infectées ou armées sont ensuite traitées pendant 1 h avec de la mitomycine C (Sigma ; 50 µg/ml) afin de stopper leur division. Après 5 jours d'incubation dans les différentes conditions de cellules P815 et B16F0 et les splénocytes murins, la prolifération des lymphocytes T est mesurée par un test d'incorporation de thymidine tritiée.

2- Résultats :

2-1 Construction des MVA recombinants

Les virus MVA recombinants (MVATG14205; MVATG14237 et MVATG14240) sont générés par recombinaison homologue dans des cellules embryonnaires de poulet à l'aide des différents plasmides de transfert (pTG14205; pTG14237 et pTG14240) et d'un virus MVA sauvage MVAN33 comme décrit dans la demande de brevet WO 9903885.

2-2 Evaluation de l'expression des différents anticorps après infection de cellules embryonnaires de poulet (CEP) avec les différents virus MVA recombinants.

5 L'expression des différents anticorps (TR310, H57-597 et KT3) est analysée par Western Blot après infection de CEP avec les virus MVA recombinants. Les résultats observés montrent qu'il y a bien expression d'immunoglobuline de type IgG de rat dans les cellules infectées avec les virus MVATG14205 et MVATG14240. Après infection avec le MVATG14237, il y a également
10 expression d'une immunoglobuline de type IgG de hamster. Ces résultats sont révélés par la présence d'une bande spécifique migrant à environ 60 kDa et correspondant à la chaîne lourde de l'immunoglobuline. Aucune bande spécifique n'a pu être observée après infection de CEP par le virus contrôle MVAN33.

15

2-3 Analyse par cytométrie de flux de l'expression des différents anticorps après infection de cellules BHK21 avec les différents virus recombinants.

20 L'expression et l'assemblage des 3 anticorps sont évalués par cytométrie de flux (Figure 2). Des cellules BHK21 sont infectées à une MOI de 1 avec les 3 virus recombinants. L'analyse par FACS a permis de mettre en évidence l'expression d'IgG de surface de hamster (H57-597) et de rat (TR310 et KT3) après incubation des cellules infectées avec des anticorps
25 dirigés spécifiquement contre des IgG de rat et de hamster. Cette analyse a également permis de montrer l'expression de chaîne légère de type kappa dans les cellules BHK21 infectées avec les virus MVATG14205 et MVATG14240. Ces résultats permettent de montrer que l'infection de cellules BHK21 par les
30 différents virus MVA recombinants entraîne l'expression d'immunoglobulines membranaires correctement réarrangées.

2-4 Etude *in vitro* de la fonctionnalité des différents virus MVA recombinants.

35 La fonctionnalité des virus MVA recombinants est testée en réalisant des test de prolifération sur splénocytes murins. Pour cela 2 types de modèles murins sont utilisés, les cellules P815HT (Figure 3) et les cellules B16F0 (Figure 4). Ces 2 types

de cellules sont infectés avec les virus recombinants afin d'exprimer à leur surface des anticorps transmembranaires dirigés contre tout ou partie du complexe TCR/CD3 murin. Nous avons mesuré la prolifération induite par la mise en contact de

5 cellules P815HT et B16F0 infectées avec des splénocytes murins naifs d'un haplotype semblable. Dans un premier temps, des cellules P815HT (faiblement immunogène ; H2d ; exprimant le CMHI, ICAMI et CD48) sont infectées avec les 3 virus recombinants et un virus MVAN33 contrôle. En parallèle les mêmes

10 cellules P815HT sont incubées avec les anticorps TR310 et H57-597 afin de les armer d'anticorps par l'intermédiaire de leur récepteur Fc. Pour le virus MVATG14205 (stimulation des cellules Vbêta 7 murines), la stimulation induite par des cellules P815 infectées est faiblement supérieure à celle obtenue avec les

15 cellules armées. De plus, le niveau de prolifération reste très faible comme attendu avec la spécificité de l'anticorps. Avec les virus MVATG14237 et MVATG14240, l'indice obtenu avec les cellules infectées est nettement supérieur à celui obtenu avec les cellules armées. Les indices obtenus avec les cellules

20 infectées par les 3 virus sont très nettement supérieurs à ceux obtenus avec des agents mitogènes puissants comme la concanavaline A ou l'interleukine-2. Enfin, nous avons pu mettre en évidence dans tous les cas un effet dose proportionnel au nombre de cellules infectées mis en contact avec les

25 splénocytes. Aucune stimulation n'a pu être observée avec des cellules P815HT non infectées, armées avec un anticorps témoins ou infectées avec un virus contrôle.

De manière identique, les cellules B16F0 sont utilisées dans le même type d'expérience (Figure 4). Ces cellules murines

30 B16F0 sont non immunogènes et ne possèdent aucune molécule de co-stimulation. Nous avons ainsi mis en évidence une forte prolifération de splénocytes naifs après contact avec des cellules infectées. De façon identique, les cellules infectées avec le MVATG14205 induisent une prolifération inférieure aux

35 cellules infectées avec les virus MVATG14237 et MVATG14240. Pour ces deux derniers, l'indice de prolifération obtenu avec 20000 cellules est comparable à celui obtenu avec la Con A. Dans ce modèle, la quantité de cellules infectées semble également jouer sur l'indice de prolifération obtenu (effet dose).

En conclusion, il apparaît très clairement que les 3 virus recombinants sont fonctionnels. L'expression des anticorps TR310, H57-597 et KT3 à la surface de cellules permet d'induire, selon l'invention, une forte prolifération de cellules T naïves.

- 5 Cette stimulation est de manière avantageuse plus importante que celle obtenue avec des cellules armées avec les mêmes anticorps par l'intermédiaire de récepteur de type Fc, mais également que celle obtenue avec de puissants agents mitogènes tels que la ConA.

REVENDEICATIONS

1 - Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères comprenant :

5 - soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique ;

10 - soit au moins une cellule cible ne produisant pas naturellement des anticorps et génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique précédente,

 caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt thérapeutique code pour tout ou partie d'un anticorps qui sera exprimé à la surface de ladite cellule cible et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

15 2 - Matériel biologique selon la revendication 1 caractérisé en ce que ladite séquence d'acide nucléique est sous la forme d'une séquence d'ADN ou d'ARN nue.

 3 - Matériel biologique selon la revendication 1 caractérisé en ce que ladite séquence d'acide nucléique est un vecteur permettant le transfert dudit gène d'intérêt thérapeutique dans lesdites cellules cibles.

20 4 - Matériel biologique selon la revendication 3 caractérisé en ce que ledit vecteur est un vecteur viral.

 5 - Matériel biologique selon la revendication 4 caractérisé en ce que ledit vecteur viral est un vecteur adénoviral, rétroviral, un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modifed Virus Ankara (MVA).

30 6 - Matériel biologique selon la revendication 3 caractérisé en ce que ledit vecteur consiste en au moins une dite séquence d'acide nucléique complexée ou conjuguée à au

moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire protique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L -2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés.

7 - Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que ladite séquence d'acide nucléique contient un gène codant pour la chaîne lourde d'un anticorps capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, fusionnée avec un polypeptide transmembranaire.

8 - Matériel biologique selon la revendication 7 caractérisé en ce que ladite séquence d'acide nucléique contient en outre un gène codant pour la chaîne légère d'un anticorps capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

9 - Matériel biologique selon la revendication 7 ou 8 caractérisé en ce que ledit polypeptide transmembranaire est sélectionné parmi le groupe consistant en une glycoprotéine, une lipoprotéine, un récepteur membranaire.

10 - Matériel biologique selon la revendication 9 caractérisé en ce que ledit polypeptide transmembranaire est sélectionné parmi le groupe consistant en la glycoprotéine du virus de la rage, la gp160, le CD4.

11 - Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que ledit polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule est un récepteur.

12 - Matériel biologique selon la revendication 11
caractérisé en ce que ladite cellule effectrice cytotoxique est
sélectionnée parmi le groupe consistant en les macrophages, les
lymphocytes T cytotoxiques (TCL) et les cellules tueuses (NK),
5 ou leurs cellules dérivées.

13 - Matériel biologique selon les revendications 11 et
12 caractérisé en ce que ledit récepteur est sélectionné parmi
le groupe consistant en tout ou partie du complexe TCR, plus
particulièrement le TCR- α , le TCR- β ou le CD3, le CD8, CD4,
10 CD28, LFA-1, 4-1BB, CD47, CD2, CD9, CD45, CD40, les récepteurs
de cytokines, telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, le
V α 14NKT, NKAR, le récepteur Fc.

14 - Matériel biologique selon l'une quelconque des
revendications précédentes caractérisé en ce que ladite cellule
15 cible est une cellule de mammifère tumorale, une cellule de
mammifère infectée par un agent pathogène viral ou une cellule
de mammifère infectée par un agent pathogène bactérien.

15 - Matériel biologique selon la revendication 1
caractérisé en ce qu'il est constitué par au moins une cellule
20 cible ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une
forme permettant leur administration dans l'organisme d'un
mammifère ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, ladite
cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une
séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant
25 pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de
ladite cellule cible et en ce que ledit anticorps est capable
de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule
effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué
dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

30 16 - Matériel biologique selon la revendication 15
caractérisé en ce que lesdites cellules cibles proviennent du
mammifère à traiter.

17 - Matériel biologique selon la revendication 15
caractérisé en ce que lesdites cellules cibles proviennent d'un
35 autre mammifère que celui à traiter et ont subi un traitement
les rendant compatibles.

18 - Matériel biologique selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, au moins une séquence d'ADN assurant l'expression d'un composé impliqué dans l'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper.

19 - Utilisation d'un matériel biologique selon l'une des revendications 1 à 18 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention de cancers ou d'infections virales.

20 - Utilisation d'une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles génétiquement modifiées par une dite séquence d'acide nucléique, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule cible et capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène.

21 - Composition pharmaceutique comprenant un matériel biologique selon l'une des revendications 1 à 18, avantageusement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

22 - Composition pharmaceutique selon la revendication 21, comprenant un matériel biologique selon l'une des revendications 15 à 17 et un composé naturellement responsable de l'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper.

23 - Composition pharmaceutique selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit composé est une cytokine ou une chemokine.

24 - Cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée par au moins une séquence d'acide nucléique contenant

au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement
5 modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

25 - Procédé de préparation d'une cellule selon la
10 revendication 24, caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène
15 dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte
20 T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique.

Figure 1

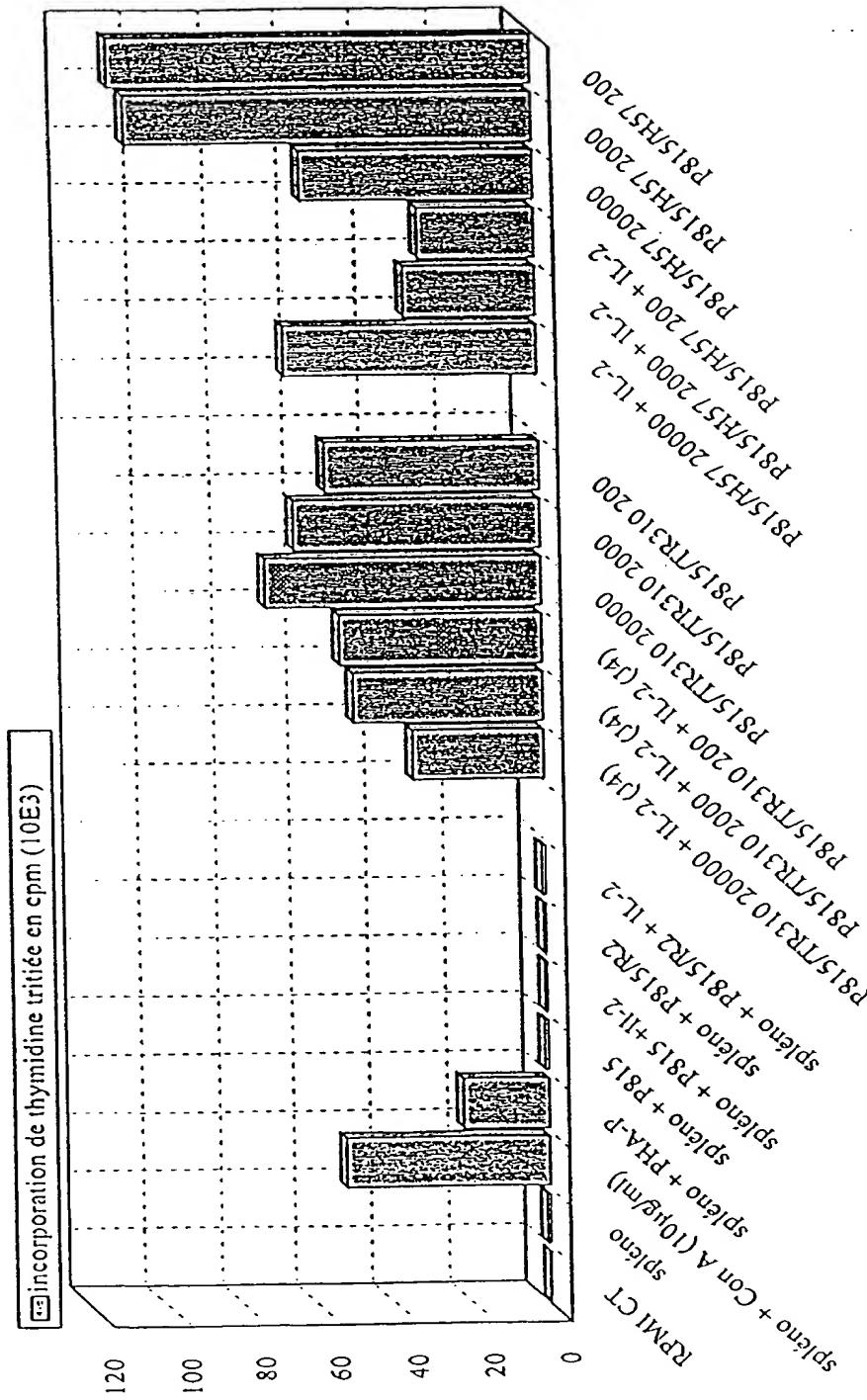


Figure 2.A

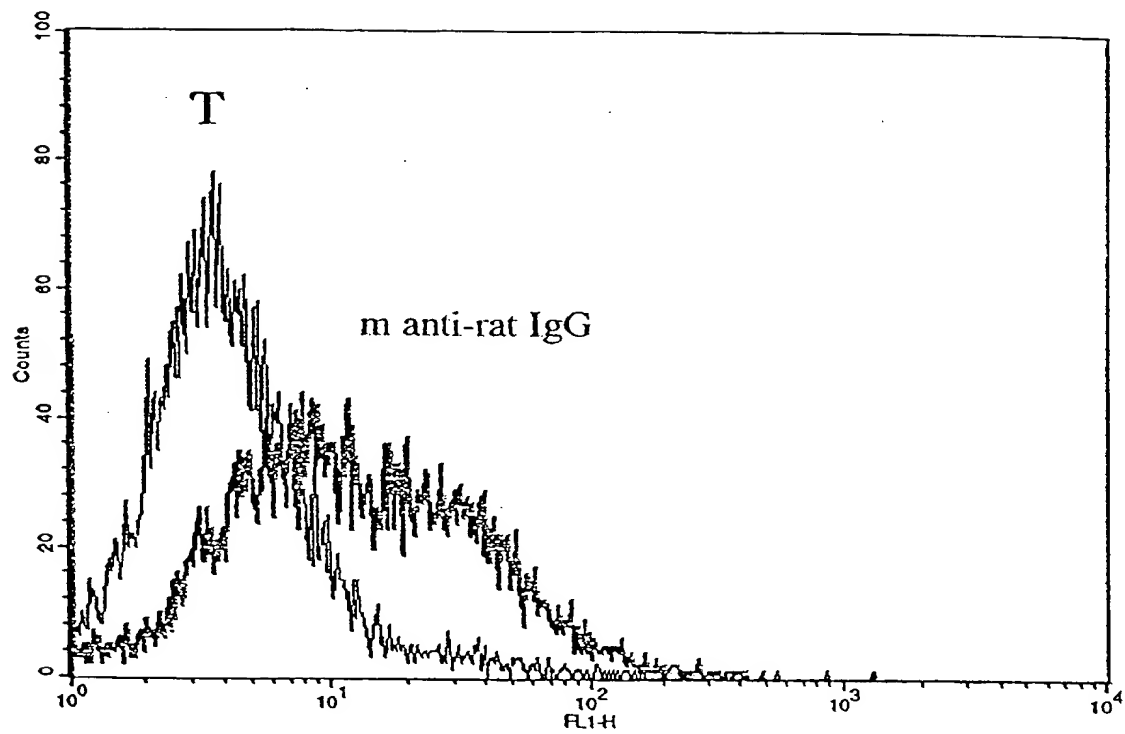


Figure 2.B

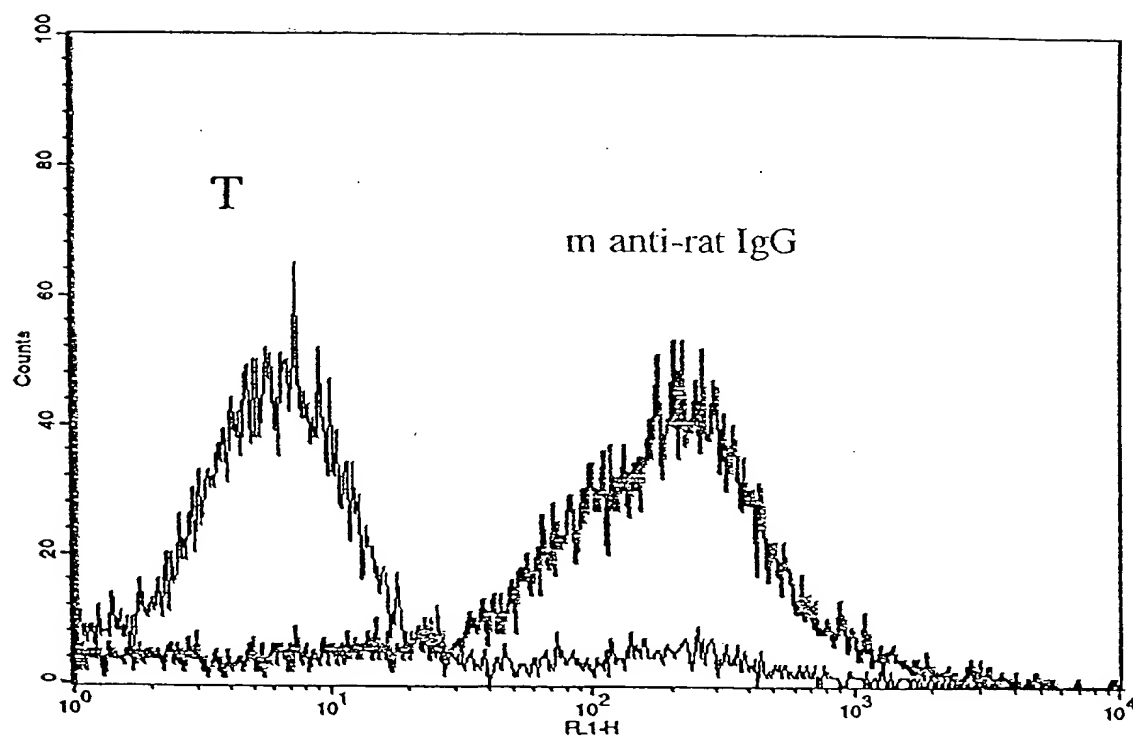
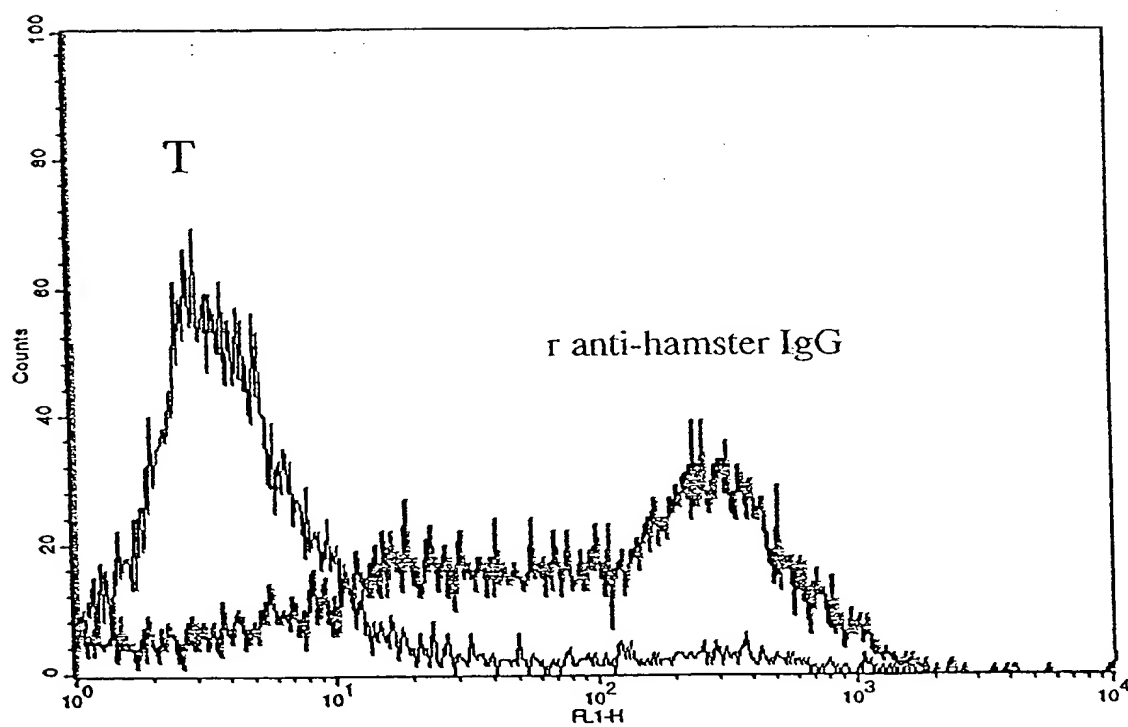


Figure 2.C



5/6

Figure 3

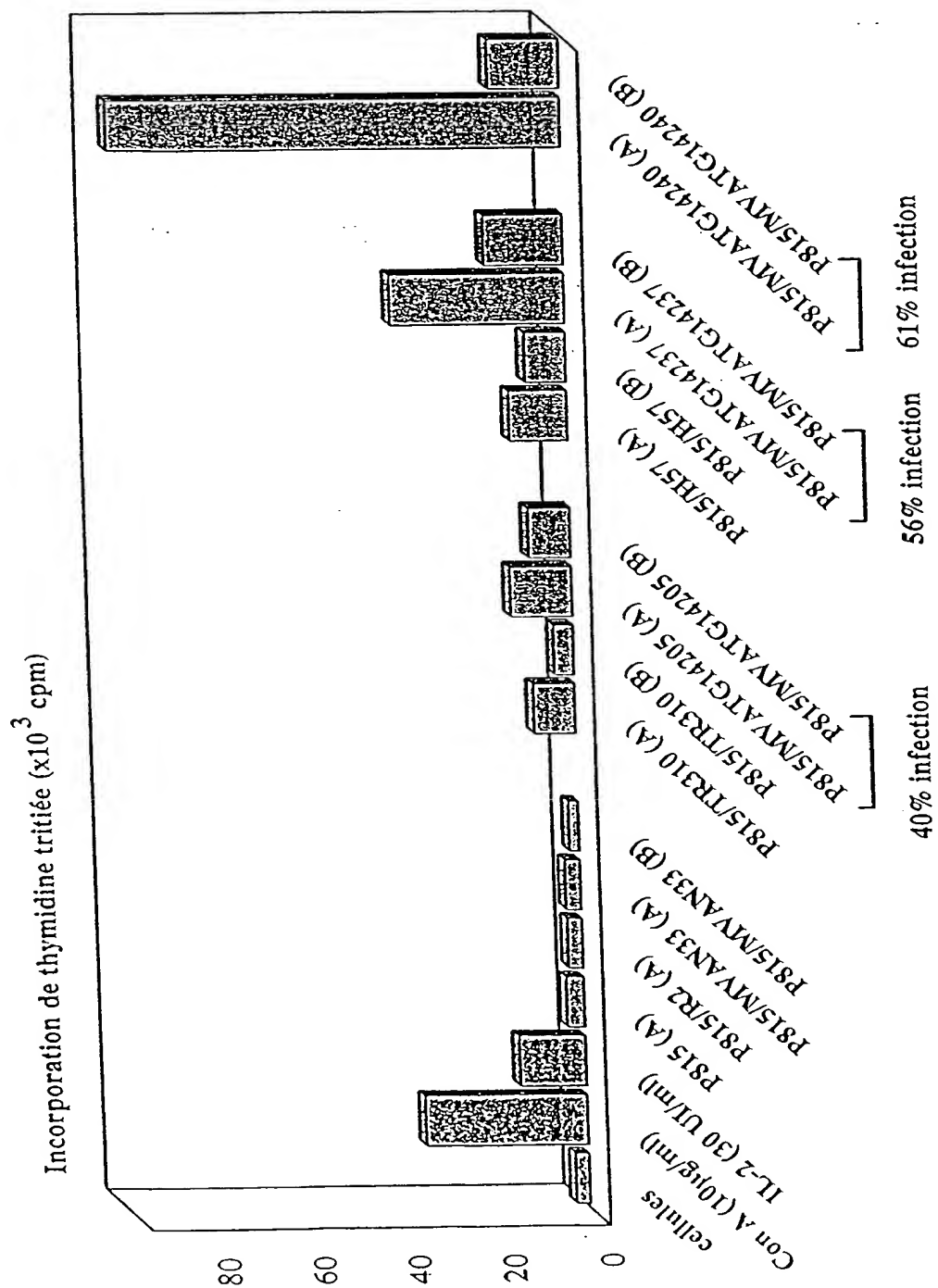
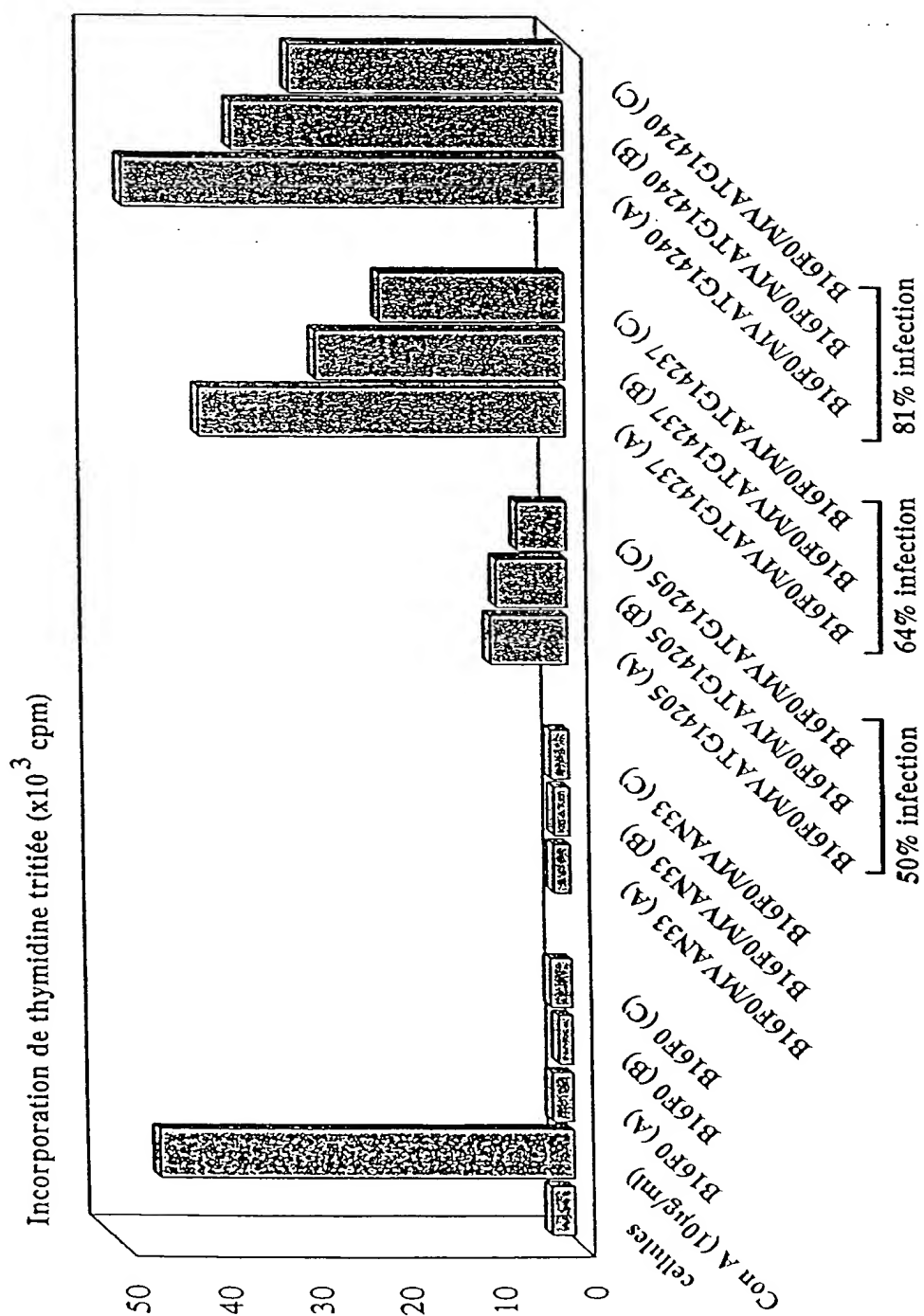


Figure 4



Translation
09/806721

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 160012900

NOV 09 2001

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference 340214/17794	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02551	International filing date (day/month/year) 20 October 1999 (20.10.99)	Priority date (day/month/year) 22 October 1998 (22.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/13		
Applicant TRANSGENE S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 May 2000 (16.05.00)	Date of completion of this report 24 August 2000 (24.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02551

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-27, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-25, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/6-6/6, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: FR-A-2 758 569 (CNRS) 24 July 1998

D2: S. DESSUREAULT ET AL: JOURNAL OF SURGICAL
RESEARCH, Vol. 64, No. 1, 15 July 1996,
pages 42-48

D3: A. GUARINI ET AL: CYTOKINES AND MOLECULAR
THERAPY, Vol. 1, No. 1, March 1995, pages 57-64

These same reference numbers shall be used in further
proceedings.

1. Novelty (PCT Article 33(2)) and Inventive Step
(PCT Article 33(3))

1.1 The methods disclosed in Claims 1 to 25 are
considered to be novel and inventive in light of D1
to D3.

D1 discloses a biological material for preparing
pharmaceutical compositions for the treatment of

mammals by means of the transfer of an antibody gene into mammalian cells and a pharmaceutical composition relating to said antibody.

Said mammalian cells, which do not produce antibodies naturally, are selected from keratinocytes, hepatocytes, skin fibroblasts, myoblasts, endothelial cells and hematopoietic stem cells.

Following the antibody gene transfer, the cells are capable of secreting a therapeutically effective amount of said antibody into the bloodstream of a mammal. Said cells also have a long life span in the organism of the mammal.

The activity of the antibody is directed against a tumour cell specific antigen or an antigen specific to virus-infected cells, i.e. "target" cells rather than effector cells.

D2 describes cancer cell lines transfected with vectors consisting of at least one CD80 coding sequence. Said lines are used for inducing proliferation and cytotoxic activity by effector cells (NK cells and CTL cells).

D3 relates to HLA-A2 melanoma cells, which, after transduction, are capable of generating a specific anti-tumour cytotoxic T-lymphocyte response.

- 1.2 The subject matter of Claim 1 therefore differs from the prior art in that the activity of the antibody produced by the transformed cells is directed against effector cells, and also in that the gene of

interest does not code for an antibody.

As a result, the subject matter of Claim 1 is novel (PCT Article 33(2)).

The problem which the present invention aims to solve can therefore be considered to be that of providing additional biological materials for preparing pharmaceutical compositions for the treatment of mammals.

The solution to this problem, as proposed in Claim 1 of the present application, is considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)) for the following reasons:

D1 to D3 describe either an activity of the expressed antibody directed against "target" cells, or specific (proliferative, cytotoxic or anti-tumoural) responses by genes of therapeutic interest. There is no indication that would lead to combining the information in said documents.

It follows that none of said documents renders the expression of an antibody in said cells obvious, said antibody being capable of binding to a polypeptide on the surface of a cytotoxic effector cell or a T-lymphocyte helper.

Claims 2-14 are dependent on Claim 1 and, as such, therefore also fulfil the requirements of the PCT concerning novelty and inventive step.

This is also true of Claims 15-25 which relate to pharmaceutical compositions containing said

materials, the use of said material and the method for producing a cell as per the present application.

- 1.3 It follows that the present application according to Claims 1-25 fulfils the requirements of PCT Article 33(2) and 33(3).

TRAITE D'OPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 juin 2000 (15.06.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02551	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794
Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 octobre 1999 (20.10.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 octobre 1998 (22.10.98)
Déposant ACRES, Bruce etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

16 mai 2000 (16.05.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Aino Metcalfe

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

TRAITE D'OPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 juin 2000 (15.06.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	
Demande internationale no PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 octobre 1999 (20.10.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse

ACRES, Bruno
10, rue Jean Hermann
F-67000 Strasbourg
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

CA

Domicile (nom de l'Etat)

FR

no de téléphone

no de télécopieur

no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☒ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse

ACRES, Bruce
10, rue Jean Hermann
F-67000 Strasbourg
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

CA

Domicile (nom de l'Etat)

FR

no de téléphone

no de télécopieur

no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:
Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Aino Metcalfe

no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 28 AUG 2000

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

6T



Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20/10/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 22/10/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/13		
Déposant TRANSGENE S.A. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 16/05/2000	Date d'achèvement du présent rapport 24.08.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Novak, S N° de téléphone +49 89 2399 8930 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02551

I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après *(les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.)* :

Description, pages:

1-27 version initiale

Revendications, N°:

1-25 version initiale

Dessins, feuilles:

1/6-6/6 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02551

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1 - 25
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1 - 25
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1 - 25
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: FR-A-2 758 569 (CNRS) 24 juillet 1998

D2: S. DESSUREAULT ET AL.: JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, vol. 64, no. 1, 15 juillet 1996, pages 42-48

D3: A. GUARINI ET AL.: CYTOKINES AND MOLECULAR THERAPY, vol. 1, no. 1, mars 1995, pages 57-64

Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après, seront utilisés dans toute la suite de la procédure.

ad V.

1. Nouveauté (article 33(2) PCT et Activité Inventive (article 33(3) PCT)

1.1. Les procédés objets des revendications 1 à 25 sont considérés comme nouveaux et inventifs au vu des documents D1 à D3.

D1 divulgue un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène d'anticorps dans des cellules de mammifère et une composition pharmaceutique concernant cet anticorps.

Lesdites cellules de mammifère, qui ne produisent pas naturellement d'anticorps ont été choisies parmi les kératinocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de peau, les myoblastes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoiétiques.

Suivant le transfert du gène d'anticorps les cellules sont capables de sécréter dans la circulation sanguine d'un mammifère une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps. En outre lesdites cellules possèdent une longue durée de vie dans l'organisme du mammifère.

L'activité du anticorps est dirigée contre un antigène spécifique de cellules tumorales ou contre un antigène spécifique de cellules infectées par un virus, i.e. de cellules "target", et non des cellules effectrices.

D2 décrit des lignées cellulaires cancéreuses transfectées avec les vecteurs

consistants au moins d'une séquence codant CD80. Ces lignées sont utilisées pour l'induction de la prolifération et l'activité cytotoxique par des cellules effectrices (cellules NK, et cellules CTL).

D3 concerne des cellules de mélanome HLA-A2, qui après la transduction sont capables de générer une réponse spécifique des cellules T-lymphocytes cytotoxiques contre des tumeurs.

- 1.2. L'objet de la revendication 1 diffère donc de l'état de la technique en ce que l'activité de l'anticorps produit par les cellules transformées est dirigée contre des cellules effectrices, ou bien en ce que le gène d'intérêt ne code pas pour un anticorps.

L'objet de la revendication 1 est donc nouveau (article 33(2) PCT).

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme étant la mise à la disposition de matériaux biologiques additionnels pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères.

La solution de ce problème proposée dans la revendication 1 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive (article 33(3) PCT), et ce pour les raisons suivantes:

D1 à D3 décrivent soit une activité de l'anticorps exprimé dirigé contre des cellules "target", soit des réponses spécifiques (proliferative, cytotoxique, ou anti-tumorale) effectuées par des gènes d'intérêt thérapeutique. Il n'y a aucune indication, qui aimerait à combiner les informations desdits documents.

Il en suit qu'aucun des documents ne rend évident l'expression d'un anticorps dans lesdites cellules, qui serait capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper.

Les revendications 2 - 14 dépendent de la revendication 1 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.

Ceci est aussi valable pour les revendications 15 - 25, qui ont pour objet des

compositions pharmaceutiques comprenant lesdits matériaux, l'utilisation de ce matériel, et le procédé de fabrication d'une cellule selon l'application présente.

- 1.3. Par conséquent, la demande présente - selon les revendications 1 à 25 - remplit les conditions énoncées dans les articles 33(2) et 33(3) PCT.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20/10/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 22/10/1998
Déposant TRANSGENE S.A. et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.



la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listing des séquences :



contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.



déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.



La déclaration, selon laquelle le listing des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listing des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2.



Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3.



Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°



suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No

PCT/FR 99/02551

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/13 C12N5/10 A61K48/00 A61K35/14 A61P31/12
A61P35/00 //C07K16/28, C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 758 569 A (CNRS) 24 July 1998 (1998-07-24) cited in the application examples claims	1-25
A	S. DESSUREAULT ET AL.: "Allogeneic lymphocyte responses to B7-1 expressing human cancer cell lines." JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, vol. 64, no. 1, 15 July 1996 (1996-07-15), pages 42-48, XP002113685 San Diego, CA, États-Unis abstract	1-25
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April 2000

Date of mailing of the international search report

20/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/02551

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A. GUARINI ET AL.: "IL-2 gene-transduced human HLA-A2 melanoma cells can generate a specific antitumor cytotoxic T-lymphocyte response." CYTOKINES AND MOLECULAR THERAPY, vol. 1, no. 1, March 1995 (1995-03), pages 57-64, XP002113686 Londres, Grande-Bretagne abstract	1-25
A	WO 97 02355 A (GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH) 23 January 1997 (1997-01-23) claims	5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02551

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR 2758569	A	24-07-1998	EP	0966532 A	29-12-1999
			WO	9831808 A	23-07-1998
WO 9702355	A	23-01-1997	AU	6611096 A	05-02-1997
			BR	9609303 A	25-05-1999
			CA	2225278 A	23-01-1997
			CZ	9704241 A	18-03-1998
			EP	0836648 A	22-04-1998
			HU	9802217 A	28-01-1999
			JP	11509091 T	17-08-1999
			NO	980026 A	02-01-1998
			NZ	313597 A	28-01-1999
			PL	324347 A	25-05-1998

PROCEDE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

04 APR 2001

PCT/FR99/02551 04 MAR 2001

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

ARRIVEE
12 MAI 2000
CABINET
REGIMBEAU

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA
COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 04 mai 2000 (04.05.00)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794		AVIS IMPORTANT
Demande internationale no PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 octobre 1999 (20.10.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 octobre 1998 (22.10.98)
Déposant TRANSGENE S.A. etc		

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AU,JP,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
CA,EP

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le
04 mai 2000 (04.05.00) sous le numéro WO 00/24896

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé J. Zahra
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

04 APR 2001

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20/10/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 22/10/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/13		
Déposant TRANSGENE S.A. et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 16/05/2000	Date d'achèvement du présent rapport 24.08.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Novak, S N° de téléphone +49 89 2399 8930 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02551

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-27 version initiale

Revendications, N°:

1-25 version initiale

Dessins, feuilles:

1/6-6/6 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02551

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1 - 25
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1 - 25
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1 - 25
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: FR-A-2 758 569 (CNRS) 24 juillet 1998
D2: S. DESSUREAULT ET AL.: JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, vol. 64,
no. 1, 15 juillet 1996, pages 42-48
D3: A. GUARINI ET AL.: CYTOKINES AND MOLECULAR THERAPY, vol. 1,
no. 1, mars 1995, pages 57-64

Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après, seront utilisés dans toute la suite de la procédure.

ad V.

1. Nouveauté (article 33(2) PCT et Activité Inventive (article 33(3) PCT)
 - 1.1. Les procédés objets des revendications 1 à 25 sont considérés comme nouveaux et inventifs au vu des documents D1 à D3.

D1 divulgue un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène d'anticorps dans des cellules de mammifère et une composition pharmaceutique concernant cet anticorps.

Lesdites cellules de mammifère, qui ne produisent pas naturellement d' anticorps ont été choisies parmi les kératinocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de peau, les myoblastes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoiétiques.

Suivant le transfert du gène d'anticorps les cellules sont capables de sécréter dans la circulation sanguine d'un mammifère une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps. En outre lesdites cellules possèdent une longue durée de vie dans l'organisme du mammifère.

L'activité du anticorps est dirigée contre un antigène spécifique de cellules tumorales ou contre un antigène spécifique de cellules infectées par un virus, i.e. de cellules "target", et non des cellules effectrices.

D2 décrit des lignées cellulaires cancéreuses transfectées avec les vecteurs

consistants au moins d'une séquence codant CD80. Ces lignées sont utilisées pour l'induction de la prolifération et l'activité cytotoxique par des cellules effectrices (cellules NK, et cellules CTL).

D3 concerne des cellules de mélanome HLA-A2, qui après la transduction sont capables de générer une réponse spécifique des cellules T-lymphocytes cytotoxiques contre des tumeurs.

- 1.2. L'objet de la revendication 1 diffère donc de l'état de la technique en ce que l'activité de l'anticorps produit par les cellules transformées est dirigée contre des cellules effectrices, ou bien en ce que le gène d'intérêt ne code pas pour un anticorps.

L'objet de la revendication 1 est donc nouveau (article 33(2) PCT).

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme étant la mise à la disposition de matériaux biologiques additionnels pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères.

La solution de ce problème proposée dans la revendication 1 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive (article 33(3) PCT), et ce pour les raisons suivantes:

D1 à D3 décrivent soit une activité de l'anticorps exprimé dirigé contre des cellules "target", soit des réponses spécifiques (proliferative, cytotoxique, ou anti-tumorale) effectuées par des gènes d'intérêt thérapeutique. Il n'y a aucune indication, qui aimerait à combiner les informations desdits documents.

Il en suit qu'aucun des documents ne rend évident l'expression d'un anticorps dans lesdites cellules, qui serait capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper.

Les revendications 2 - 14 dépendent de la revendication 1 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.

Ceci est aussi valable pour les revendications 15 - 25, qui ont pour objet des

compositions pharmaceutiques comprenant lesdits matériaux, l'utilisation de ce matériel, et le procédé de fabrication d'une cellule selon l'application présente.

- 1.3. Par conséquent, la demande présente - selon les revendications 1 à 25 - remplit les conditions énoncées dans les articles 33(2) et 33(3) PCT.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PTO/PCT No. 04 APR 2001

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

~~PTO/PCT No. 04 MAR 2001~~

Phase Nationale 22.04.01

PCT

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques.
CABINET REGIMBEAU
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

ARRIVEE

29 AOUT 2000

CABINET
REGIMBEAU

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 24.08.2000

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
340214/17794

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR99/02551

Date du dépôt international (jour/mois/année)
20/10/1999

Date de priorité (jour/mois/année)
22/10/1998

Déposant
TRANSGENE S.A. et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.

2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.

3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Vullo, C

Tél. +49 89 2399-8061



PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20/10/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 22/10/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/13		
Déposant TRANSGENE S.A. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 16/05/2000	Date d'achèvement du présent rapport 24.08.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 </div> </div>	Fonctionnaire autorisé Novak, S N° de téléphone +49 89 2399 8930



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02551

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-27 version initiale

Revendications, N°:

1-25 version initiale

Dessins, feuilles:

1/6-6/6 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02551

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1 - 25
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1 - 25
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1 - 25
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: FR-A-2 758 569 (CNRS) 24 juillet 1998

D2: S. DESSUREAULT ET AL.: JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, vol. 64, no. 1, 15 juillet 1996, pages 42-48

D3: A. GUARINI ET AL.: CYTOKINES AND MOLECULAR THERAPY, vol. 1, no. 1, mars 1995, pages 57-64

Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après, seront utilisés dans toute la suite de la procédure.

ad V.

1. Nouveauté (article 33(2) PCT et Activité Inventive (article 33(3) PCT)

1.1. Les procédés objets des revendications 1 à 25 sont considérés comme nouveaux et inventifs au vu des documents D1 à D3.

D1 divulgue un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène d'anticorps dans des cellules de mammifère et une composition pharmaceutique concernant cet anticorps.

Lesdites cellules de mammifère, qui ne produisent pas naturellement d' anticorps ont été choisies parmi les kératinocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de peau, les myoblastes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoiétiques.

Suivant le transfert du gène d'anticorps les cellules sont capables de sécréter dans la circulation sanguine d'un mammifère une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps. En outre lesdites cellules possèdent une longue durée de vie dans l'organisme du mammifère.

L'activité du anticorps est dirigée contre un antigène spécifique de cellules tumorales ou contre un antigène spécifique de cellules infectées par un virus, i.e. de cellules "target", et non des cellules effectrices.

D2 décrit des lignées cellulaires cancéreuses transfectées avec les vecteurs

consistants au moins d'une séquence codant CD80. Ces lignées sont utilisées pour l'induction de la prolifération et l'activité cytotoxique par des cellules effectrices (cellules NK, et cellules CTL).

D3 concerne des cellules de mélanome HLA-A2, qui après la transduction sont capables de générer une réponse spécifique des cellules T-lymphocytes cytotoxiques contre des tumeurs.

- 1.2. L'objet de la revendication 1 diffère donc de l'état de la technique en ce que l'activité de l'anticorps produit par les cellules transformées est dirigée contre des cellules effectrices, ou bien en ce que le gène d'intérêt ne code pas pour un anticorps.

L'objet de la revendication 1 est donc nouveau (article 33(2) PCT).

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme étant la mise à la disposition de matériaux biologiques additionnels pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères.

La solution de ce problème proposée dans la revendication 1 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive (article 33(3) PCT), et ce pour les raisons suivantes:

D1 à D3 décrivent soit une activité de l'anticorps exprimé dirigé contre des cellules "target", soit des réponses spécifiques (proliférative, cytotoxique, ou anti-tumorale) effectuées par des gènes d'intérêt thérapeutique. Il n'y a aucune indication, qui aimerait à combiner les informations desdits documents.

Il en suit qu'aucun des documents ne rend évident l'expression d'un anticorps dans lesdites cellules, qui serait capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper.

Les revendications 2 - 14 dépendent de la revendication 1 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.

Ceci est aussi valable pour les revendications 15 - 25, qui ont pour objet des

compositions pharmaceutiques comprenant lesdits matériaux, l'utilisation de ce matériel, et le procédé de fabrication d'une cellule selon l'application présente.

- 1.3. Par conséquent, la demande présente - selon les revendications 1 à 25 - remplit les conditions énoncées dans les articles 33(2) et 33(3) PCT.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PTO/PCT Rec'd 14 APR 2001
PCT

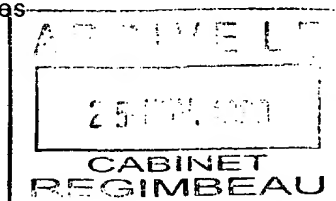
**NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL**

(règle 24.2.a) du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE



Date d'expédition (jour/mois/année) 15 novembre 1999 (15.11.99)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	Demande internationale no PCT/FR99/02551

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

TRANSGENE S.A. (pour tous les Etats désignés sauf US)
ACRES, Bruno etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 20 octobre 1999 (20.10.99)
Date(s) de priorité revendiquée(s) : 22 octobre 1998 (22.10.98)
Date de réception de l'exemplaire original
par le Bureau international : 08 novembre 1999 (08.11.99)
Liste des offices désignés :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, CA, JP, US

ATTENTION

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

- ☒ les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale
☒ la confirmation des désignations faites par mesure de précaution
☐ les exigences relatives aux documents de priorité.

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

n° de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

S. Baharlou

n° de téléphone (41-22) 338.83.38

RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LES DELAIS DANS LESQUELS DOIT ETRE ABORDEE LA PHASE NATIONALE

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la notification de la réception de l'exemplaire original (formulaire PCT/IB/301) en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, telles qu'elles sont prescrites par les législations nationales.

Le délai d'accomplissement de ces actes de procédure est de **20 MOIS** à compter de la date de priorité ou, pour les Etats désignés qui ont été élus par le déposant dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure, de **30 MOIS** à compter de la date de priorité, à condition que cette élection ait été effectuée avant l'expiration du 19^e mois à compter de la date de priorité. Certains offices désignés (ou élus) ont fixé des délais qui expirent au-delà de 20 ou 30 mois à compter de la date de priorité. D'autres offices accordent une prolongation des délais ou un délai de grâce, dans certains cas moyennant le paiement d'une taxe supplémentaire.

En plus de ces actes de procédure, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. **Il appartient au déposant** de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices désignés n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

Des informations détaillées concernant les actes de procédure à accomplir pour aborder la phase nationale auprès de chaque office désigné, les délais applicables et la possibilité d'obtenir une prolongation des délais ou un délai de grâce et toutes autres conditions applicables figurent dans le volume II du Guide du déposant du PCT. Les exigences concernant le dépôt d'une demande d'examen préliminaire international sont exposées dans le chapitre IX du volume I du Guide du déposant du PCT.

GR et ES sont devenues liées par le chapitre II du PCT le 7 septembre 1996 et le 6 septembre 1997, respectivement, et peuvent donc être élues dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure présentée le 7 septembre 1996 (ou à une date postérieure) ou le 6 septembre 1997 (ou à une date postérieure), respectivement, quelle que soit la date de dépôt de la demande internationale (voir le second paragraphe, ci-dessus).

Veuillez noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

CONFIRMATION DES DESIGNATIONS FAITES PAR MESURE DE PRECAUTION

Seules les désignations expresses faites dans la requête conformément à la règle 4.9.a) figurent dans la présente notification. Il est important de vérifier si ces désignations ont été faites correctement. Des erreurs dans les désignations peuvent être corrigées lorsque des désignations ont été faites par mesure de précaution en vertu de la règle 4.9.b). Toute désignation ainsi faite peut être confirmée conformément aux dispositions de la règle 4.9.c) avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité. En l'absence de confirmation, une désignation faite par mesure de précaution sera considérée comme retirée par le déposant. Il ne sera adressé aucun rappel ni invitation. Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration précisant l'Etat désigné concerné (avec l'indication de la forme de protection ou de traitement souhaitée) et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.

EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITE

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale, régionale ou internationale antérieure est revendiquée, le déposant doit présenter une copie de cette demande antérieure, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité, étant entendu que tout document de priorité peut être présenté au Bureau international avant la date de publication de la demande internationale, auquel cas ce document sera réputé avoir été reçu par le Bureau international le dernier jour du délai de 16 mois (règle 17.1.a)).

Lorsque le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois et peut être soumise au paiement d'une taxe (règle 17.1.b)).

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international, ou si la demande adressée à l'office récepteur de préparer et de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration du délai applicable mentionné aux paragraphes précédents, tout Etat désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité; toutefois, aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée.

TRAITÉ D'COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 novembre 1999 (15.11.99)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 octobre 1999 (20.10.99)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 22 octobre 1998 (22.10.98)
Déposant TRANSGENE S.A. etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un **astérisque(*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les **lettres "NR"** figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
22 octo 1998 (22.10.98)	98/13279	FR	08 nove 1999 (08.11.99)

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

S. Bahariou

no de téléphone (41-22) 338.83.38

PCT

PTC/PCT REQUÊTE

04 APR 2001

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum) 340214/17794

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION MATERIEL BIOLOGIQUE POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES DESTINEES AU TRAITEMENT DE MAMMIFERES

Cadre n° II DÉPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

TRANSGENE S.A.
11 Rue de Molsheim
67000 STRASBOURG
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) :

FR

Domicile (nom de l'Etat) :

FR

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les États désignés

☒ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique

☐ les États-Unis d'Amérique seulement

☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

ACRES Bruno
10 Rue Jean Hermann
67000 STRASBOURG
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

CA

Domicile (nom de l'Etat) :

FR

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les États désignés

☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique

☒ les États-Unis d'Amérique seulement

☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒ mandataire

☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert, AHNER Francis
WARCOIN Jacques, TEXTIER Christian, LE FORESTIER Eric
CABINET REGIMBEAU
26 Avenue Kléber
75116 PARIS
FRANCE

n° de téléphone

01 45 00 92 02

n° de télécopieur

01 45 00 46 12

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

PAUL Stéphane
7 Rue du Vieux Marché aux Poissons
67000 STRASBOURG
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :
FR

Domicile (nom de l'Etat) :
FR

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être):

Brevet régional

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée).

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AE Émirats arabes unis | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albanie | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie | <input type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie | <input type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input type="checkbox"/> BR Brésil | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus | <input type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input type="checkbox"/> CN Chine | <input type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark | <input type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie | <input type="checkbox"/> SE Suède |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne | <input type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande | <input type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input type="checkbox"/> GD Grenade | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie | <input type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input type="checkbox"/> HR Croatie | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie | <input type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israël | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique |
| <input type="checkbox"/> IN Inde | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille:

- ☐ CR Costa Rica ☐ TZ République Unie de Tanzanie
- ☐ DM Dominique

Déclaration concernant les désignations de précaution: outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITÉ		<input type="checkbox"/> autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 22 OCTOBRE 1998 (22/10/98)	98 13279	FRANCE		
(2)				
(3)				


☐ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) :

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)iii). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE			
Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA / EP	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional) 30 AOÛT 1999 FA 570204 OEB		

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT	
La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant : requête : 4 description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 27 revendications : 5 abrégé : 1 dessins : 6 partie de la description réservée au listage des séquences : Nombre total de feuilles : 43	Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input checked="" type="checkbox"/> pouvoir distinct signé 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) Copie du Rapport de Recherche

Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :	Langue de dépôt de la demande internationale : Français
--	---

Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE	
À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.	
WARCOIN Jacques	 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> CABINET RECIMBEAU CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE 26, Avenue Kléber 75116 PARIS FRANCE </div>

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Réservé au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCEARRIVEE
- 4 JUL. 2000
CABINET
REGIMBEAU

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 juin 2000 (15.06.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	
Demande internationale no PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 octobre 1999 (20.10.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:		
<input checked="" type="checkbox"/> le déposant	<input checked="" type="checkbox"/> l'inventeur	<input type="checkbox"/> le mandataire <input type="checkbox"/> le représentant commun
Nom et adresse ACRES, Bruno 10, rue Jean Hermann F-67000 Strasbourg FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) CA	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> la personne	<input checked="" type="checkbox"/> le nom	<input type="checkbox"/> l'adresse <input type="checkbox"/> la nationalité <input type="checkbox"/> le domicile
Nom et adresse ACRES, Bruce 10, rue Jean Hermann F-67000 Strasbourg FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) CA	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	
3. Observations complémentaires, le cas échéant:		
4. Une copie de cette notification a été envoyée:		
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés	
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés	
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Aino Metcalfe
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE OPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT**INFORMATIONS RELATIVES AUX
OFFICES ELUS QUI ONT RECU
NOTIFICATION DE LEUR ELECTION**

(règle 61.3 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 juin 2000 (15.06.00)		INFORMATION IMPORTANTE	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794			
Demande internationale no PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 octobre 1999 (20.10.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 octobre 1998 (22.10.98)	
Déposant TRANSGENE S.A. etc			

1. Le déposant est informé que le Bureau international a, conformément à l'article 31.7), notifié à chacun des offices suivants son élection:

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National : AU,CA,JP,US

2. Les offices suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle ils sont notifiés de leur élection; la notification de leur élection leur sera envoyée par le Bureau international seulement à leur demande:

Aucun

3. Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices mentionnés ci-dessus **avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité**. Pour ce faire, il doit payer la ou les taxes nationales et remettre, si elle est prescrite, une traduction de la demande internationale (article 39.1)a) ainsi que, le cas échéant, une traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3)b) et règle 74.1).

Certains offices ont fixé des délais supérieurs au délai mentionné ci-dessus. Pour des renseignements détaillés au sujet des délais applicables et des actes à accomplir à l'ouverture de la phase nationale auprès d'un office donné, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

L'ouverture de la phase régionale européenne est différée **jusqu'à l'expiration d'un délai de 31 mois à compter de la date de priorité** pour la totalité des Etats désignés aux fins de l'obtention d'un brevet européen.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Aino Metcalfe no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

PCT

PTO/PCT Rec'd 24 APR 2001
REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Demande internationale n°	
Date du dépôt international	
Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif) (12 caractères au maximum) 340214/17794	

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION MATERIEL BIOLOGIQUE POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES DESTINEES AU TRAITEMENT DE MAMMIFERES	
Cadre n° II DÉPOSANT	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) TRANSGENE S.A. 11 Rue de Molsheim 67000 STRASBOURG FRANCE	<input type="checkbox"/> Cette personne est aussi inventeur. n° de téléphone n° de télécopieur n° de téléimprimeur
Nationalité (nom de l'Etat) : FR	Domicile (nom de l'Etat) : FR
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input checked="" type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) ACRES Bruno 10 Rue Jean Hermann 67000 STRASBOURG FRANCE	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)
Nationalité (nom de l'Etat) : CA	Domicile (nom de l'Etat) : FR
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
<input checked="" type="checkbox"/> D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.	
Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE	
La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme: <input checked="" type="checkbox"/> mandataire <input type="checkbox"/> représentant commun	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.) MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert, AHNER Francis WARCOIN Jacques, TEXIER Christian, LE FORESTIER Eric CABINET REGIMBEAU 26 Avenue Kléber 75116 PARIS FRANCE	n° de téléphone 01 45 00 92 02 n° de télécopieur 01 45 00 46 12 n° de téléimprimeur
<input type="checkbox"/> Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.	

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

PAUL Stéphane
7 Rue du Vieux Marché aux Poissons
67000 STRASBOURG
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :
FR

Domicile (nom de l'État) :
FR

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

Domicile (nom de l'État) :

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

Domicile (nom de l'État) :

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

Domicile (nom de l'État) :

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées, une au moins doit l'être) :

Brevet régional

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AE Émirats arabes unis | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albanie | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie | <input type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie | <input type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input type="checkbox"/> BR Brésil | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus | <input type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input type="checkbox"/> CN Chine | <input type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark | <input type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie | <input type="checkbox"/> SE Suède |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne | <input type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande | <input type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input type="checkbox"/> GD Grenade | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie | <input type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input type="checkbox"/> HR Croatie | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie | <input type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israël | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique |
| <input type="checkbox"/> IN Inde | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

- ☐ CR Costa Rica ☐ TZ République Unie de Tanzanie
- ☐ DM Dominique

Déclaration concernant les désignations de précaution : outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITÉ		<input type="checkbox"/> D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 22 OCTOBRE 1998 (22/10/98)	98 13279	FRANCE		
(2)				
(3)				

☐ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : _____

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE			
Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA / EP	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional) </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> 30 AOÛT 1999 FA 570204 OEB </div>		

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT	
La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant : requête : 4 description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 27 revendications : 5 abrégé : 1 dessins : 6 partie de la description réservée au listage des séquences : _____ Nombre total de feuilles : 43	Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input checked="" type="checkbox"/> pouvoir distinct signé 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) Copie du Rapport de Recherche
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :	Langue de dépôt de la demande internationale : Français

Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE	
À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.	
WARCOIN Jacques	 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> CABINET RECIMBEAU CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE 26, Avenue Kléber 75116 PARIS FRANCE </div>

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale : 3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale : 4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Réservé au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT Rec'd 04 APR 2001

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCEARRIVEE
- 4 JUL. 2000
CABINET
REGIMBEAU

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 juin 2000 (15.06.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	
Demande internationale no PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 octobre 1999 (20.10.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:		
<input checked="" type="checkbox"/> le déposant	<input checked="" type="checkbox"/> l'inventeur	<input type="checkbox"/> le mandataire <input type="checkbox"/> le représentant commun
Nom et adresse ACRES, Bruno 10, rue Jean Hermann F-67000 Strasbourg FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) CA	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> la personne	<input checked="" type="checkbox"/> le nom	<input type="checkbox"/> l'adresse <input type="checkbox"/> la nationalité <input type="checkbox"/> le domicile
Nom et adresse ACRES, Bruce 10, rue Jean Hermann F-67000 Strasbourg FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) CA	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	
3. Observations complémentaires, le cas échéant:		
4. Une copie de cette notification a été envoyée:		
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés	
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés	
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Aino Metcalfe
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

INFORMATIONS RELATIVES AUX
OFFICES ELUS QUI ONT RECU
NOTIFICATION DE LEUR ELECTION

(règle 61.3 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 juin 2000 (15.06.00)		INFORMATION IMPORTANTE	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794			
Demande internationale no PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 octobre 1999 (20.10.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 octobre 1998 (22.10.98)	
Déposant TRANSGENE S.A. etc			

1. Le déposant est informé que le Bureau international a, conformément à l'article 31.7), notifié à chacun des offices suivants son élection:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, CA, JP, US

2. Les offices suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle ils sont notifiés de leur élection; la notification de leur élection leur sera envoyée par le Bureau international seulement à leur demande:

Aucun

3. Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices mentionnés ci-dessus **avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité**. Pour ce faire, il doit payer la ou les taxes nationales et remettre, si elle est prescrite, une traduction de la demande internationale (article 39.1)a) ainsi que, le cas échéant, une traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3)b) et règle 74.1).

Certains offices ont fixé des délais supérieurs au délai mentionné ci-dessus. Pour des renseignements détaillés au sujet des délais applicables et des actes à accomplir à l'ouverture de la phase nationale auprès d'un office donné, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

L'ouverture de la phase régionale européenne est différée jusqu'à l'expiration d'un délai de 31 mois à compter de la date de priorité pour la totalité des Etats désignés aux fins de l'obtention d'un brevet européen.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Aino Metcalfe no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

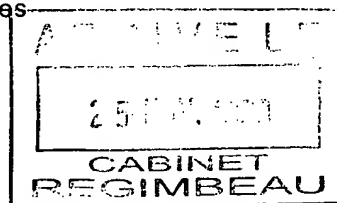
NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE



Date d'expédition (jour/mois/année) 15 novembre 1999 (15.11.99)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	Demande internationale no PCT/FR99/02551

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

TRANSGENE S.A. (pour tous les Etats désignés sauf US)
ACRES, Bruno etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 20 octobre 1999 (20.10.99)
Date(s) de priorité revendiquée(s) : 22 octobre 1998 (22.10.98)
Date de réception de l'exemplaire original
par le Bureau international : 08 novembre 1999 (08.11.99)
Liste des offices désignés :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, CA, JP, US

ATTENTION

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

- ☒ les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale
☒ la confirmation des désignations faites par mesure de précaution
☐ les exigences relatives aux documents de priorité.

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

n° de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

S. Baharlou

n° de téléphone (41-22) 338.83.38

RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LES DELAIS DANS LESQUELS DOIT ETRE ABORDEE LA PHASE NATIONALE

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la notification de la réception de l'exemplaire original (formulaire PCT/IB/301) en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, telles qu'elles sont prescrites par les législations nationales.

Le délai d'accomplissement de ces actes de procédure est de **20 MOIS** à compter de la date de priorité ou, pour les Etats désignés qui ont été élus par le déposant dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure, de **30 MOIS** à compter de la date de priorité, à condition que cette élection ait été effectuée avant l'expiration du 19^e mois à compter de la date de priorité. Certains offices désignés (ou élus) ont fixé des délais qui expirent au-delà de 20 ou 30 mois à compter de la date de priorité. D'autres offices accordent une prolongation des délais ou un délai de grâce, dans certains cas moyennant le paiement d'une taxe supplémentaire.

En plus de ces actes de procédure, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. **Il appartient au déposant** de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices désignés n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

Des informations détaillées concernant les actes de procédure à accomplir pour aborder la phase nationale auprès de chaque office désigné, les délais applicables et la possibilité d'obtenir une prolongation des délais ou un délai de grâce et toutes autres conditions applicables figurent dans le volume II du Guide du déposant du PCT. Les exigences concernant le dépôt d'une demande d'examen préliminaire international sont exposées dans le chapitre IX du volume I du Guide du déposant du PCT.

GR et ES sont devenues liées par le chapitre II du PCT le 7 septembre 1996 et le 6 septembre 1997, respectivement, et peuvent donc être élues dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure présentée le 7 septembre 1996 (ou à une date postérieure) ou le 6 septembre 1997 (ou à une date postérieure), respectivement, quelle que soit la date de dépôt de la demande internationale (voir le second paragraphe, ci-dessus).

Veuillez noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

CONFIRMATION DES DESIGNATIONS FAITES PAR MESURE DE PRECAUTION

Seules les désignations expresses faites dans la requête conformément à la règle 4.9.a) figurent dans la présente notification. Il est important de vérifier si ces désignations ont été faites correctement. Des erreurs dans les désignations peuvent être corrigées lorsque des désignations ont été faites par mesure de précaution en vertu de la règle 4.9.b). Toute désignation ainsi faite peut être confirmée conformément aux dispositions de la règle 4.9.c) avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité. En l'absence de confirmation, une désignation faite par mesure de précaution sera considérée comme retirée par le déposant. Il ne sera adressé aucun rappel ni invitation. Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration précisant l'Etat désigné concerné (avec l'indication de la forme de protection ou de traitement souhaitée) et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.

EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITE

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale, régionale ou internationale antérieure est revendiquée, le déposant doit présenter une copie de cette demande antérieure, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité, étant entendu que tout document de priorité peut être présenté au Bureau international avant la date de publication de la demande internationale, auquel cas ce document sera réputé avoir été reçu par le Bureau international le dernier jour du délai de 16 mois (règle 17.1.a)).

Lorsque le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois et peut être soumise au paiement d'une taxe (règle 17.1.b)).

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international, ou si la demande adressée à l'office récepteur de préparer et de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration du délai applicable mentionné aux paragraphes précédents, tout Etat désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité; toutefois, aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

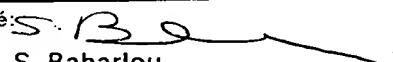
Date d'expédition (jour/mois/année) 15 novembre 1999 (15.11.99)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340214/17794	
Demande internationale no PCT/FR99/02551	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 octobre 1999 (20.10.99)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 22 octobre 1998 (22.10.98)
Déposant TRANSGENE S.A. etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un astérisque(*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
22 octo 1998 (22.10.98)	98/13279	FR	08 nove 1999 (08.11.99)

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé: 
S. Baharlou

no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

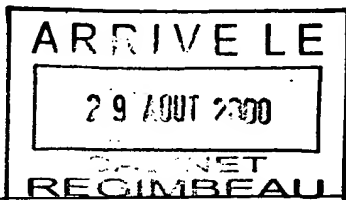
FFP

Phase Nationale 22.04.01

PCT

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques.
CABINET REGIMBEAU
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE



NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 24.08.2000

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
340214/17794

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR99/02551

Date du dépôt international (jour/mois/année)
20/10/1999

Date de priorité (jour/mois/année)
22/10/1998

Déposant
TRANSGENE S.A. et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Vullo, C

Tél. +49 89 2399-8061



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

[stamp]

Date of mailing (day/month/year) 04 May 2000 (04.05.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 340214/17794			
International application No. PCT/FR99/02551	International filing date (day/month/year) 20 October 1999 (20.10.99)	Priority date (day/month/year) 22 October 1998 (22.10.98)	
Applicant TRANSGENE S.A. etc			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,JP,US
In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, each designated Office will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).
2. The following designated Offices have waived their requirement whereby this communication must take place by that date:
CA,EP
Communication will take place only when requested by these Offices. Moreover, the applicant is not required to furnish a copy of the international application to the Offices in question (Rule 49.1)a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

04 May 2000 (04.05.00)

(date) under No. WO/ 00/24896

REMINDER REGARDING CHAPTER 11 (Article 31.2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No. (41-22)338.83.38
--	---

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des. internationale No
PCT/FR 99/02551

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/13 C12N5/10 A61K48/00 A61K35/14 A61P31/12
A61P35/00 //C07K16/28,C07K16/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 758 569 A (CNRS) 24 juillet 1998 (1998-07-24) cité dans la demande exemples revendications	1-25
A	S. DESSUREAULT ET AL.: "Allogeneic lymphocyte responses to B7-1 expressing human cancer cell lines." JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, vol. 64, no. 1, 15 juillet 1996 (1996-07-15), pages 42-48, XP002113685 San Diego, CA, États-Unis abrégé	1-25
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 avril 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/04/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Internationale No

PCT/FR 99/02551

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	A. GUARINI ET AL.: "IL-2 gene-transduced human HLA-A2 melanoma cells can generate a specific antitumor cytotoxic T-lymphocyte response." CYTOKINES AND MOLECULAR THERAPY, vol. 1, no. 1, mars 1995 (1995-03), pages 57-64, XP002113686 Londres, Grande-Bretagne abrégé	1-25
A	WO 97 02355 A (GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH) 23 janvier 1997 (1997-01-23) revendications	5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De. e Internationale No

PCT/FR 99/02551

Document brevet cité au rapport de rech rch	Date d publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2758569 A	24-07-1998	EP 0966532 A WO 9831808 A	29-12-1999 23-07-1998
WO 9702355 A	23-01-1997	AU 6611096 A BR 9609303 A CA 2225278 A CZ 9704241 A EP 0836648 A HU 9802217 A JP 11509091 T NO 980026 A NZ 313597 A PL 324347 A	05-02-1997 25-05-1999 23-01-1997 18-03-1998 22-04-1998 28-01-1999 17-08-1999 02-01-1998 28-01-1999 25-05-1998

Molecular Cloning of a Proteolytic Antibody Light Chain*

(Received for publication, September 2, 1994, and in revised form, October 6, 1994)

Qing-Sheng Gao†, M i Sun†, Sonia Tyutyulkova, David W bster§, Anthony Rees§,
Alfonso Tramontano¶, Richard J. Massey¶, and Sudhir Paul¶

From the Department of Anesthesiology and the Eppler Cancer Research Institute, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska 68198-6830, the §Department of Biochemistry, University of Bath, Calverton Down, Bath BA2 7AY, United Kingdom, and ¶IGEN Inc., Rockville, Maryland 20852

The cDNA for an antibody light chain raised by immunization against vasoactive intestinal peptide (VIP) was cloned in a bacterial expression vector, and the recombinant light chain was purified to electrophoretic homogeneity. The light chain catalyzed the hydrolysis of VIP efficiently owing to its comparatively high affinity for the substrate. In control experiments, the catalytic activity was preserved at a constant level after further chromatography of the light chain on anion-exchange and gel-filtration fast protein liquid chromatography columns, and it was removed by immunoadsorption with immobilized anti-mouse light chain antibody. The amide bond linking methylcoumarinamide (MCA) and arginine in a tripeptide unrelated in sequence to VIP was cleaved by the light chain with lower affinity and kinetic efficiency (k_{cat}/K_m). Hydrolysis of the peptidyl-MCA conjugate was inhibited competitively by the alternate substrate, VIP. The K_i and K_m values for VIP were in the same range, indicating that peptide-MCA and VIP hydrolysis occurs at a common catalytic site in the light chain. Molecular modeling suggested the presence of a serine protease-like site in the light chain. This was supported by inhibition of the hydrolytic activity by serine protease inhibitors, but not by inhibitors of other classes of proteases. These observations suggest a poorly discriminatory catalytic site, with specificity for VIP arising chiefly by means of the antigen recognition function of the light chain combining site.

Efficient catalysis by autoantibodies to vasoactive intestinal polypeptide (VIP)¹ (1) and DNA (2) has been reported, but the genesis of these activities and the identity of antigens inciting formation of the antibody catalysts are not clear. Since transition state lifetimes are very short, an antitransition state specificity is an unlikely explanation for the catalytic activity of autoantibodies. In analogy with the evolution of enzymes, sequence diversification occurring in antibody variable region genes (3) over the course of the immune response could result in the formation of catalytic active sites. The key test of this

hypothesis is that immunization with natural antigens, as opposed to commonly used transition state mimics (4), should lead to development of catalytic antibodies. A monoclonal antibody raised to VIP displays a peptidolytic activity, but this activity is expressed only in very dilute solutions (see Ref. 5 for discussion). Consequently, this antibody is unsuitable for detailed study of catalysis and demonstration of turnover, a defining feature of a true catalyst. Here, we report efficient catalysis by the recombinant light chain subunit of the anti-VIP antibody. The activity shows preference for VIP at the substrate binding step, but turnover rates for VIP and a nonhomologous protease substrate are nearly equivalent. The presence of a serine protease-like catalytic triad in the light chain was suggested by molecular modeling and supported by inhibition of the activity by serine protease inhibitors. These observations indicate a poorly discriminatory catalytic site in the light chain, with specificity for VIP arising chiefly by means of the high affinity antigen binding function.

MATERIALS AND METHODS

cDNA Amplification and Cloning—A hybridoma cell line (clone c23.5) secreting a monoclonal antibody was developed from a mouse hyperimmunized with a VIP-keyhole limpet hemocyanin conjugate (5). cDNA preparation was by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction method from RNA isolated from 3×10^7 c23.5 hybridoma cells (6) using forward (GAGTCATTCTGCGGCCGCTCATTCTCTTTGAAGCTCTTGAC) and back (GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCCATGGCCGAYGTNGTNGTATGACNCAGAC) primers corresponding to constant region residues 206–213 and framework 1 residues 1–8 (Asp-Val-Val-Met-Thr-Gln-Thr-Pro, determined by N-terminal sequencing of the reduced and alkylated light chain purified from antibody c23.5 (7)). The cDNA (801 base pairs) was inserted into pCANTAB5his₆ (8, 9) via *Sfi*I and *Not*I restriction sites (underlined). Sequencing was by the dideoxy chain termination method (30) using vector-specific primers located in the vector on the 5'-side (CAGGAAACAGCTATGAC) and 3'-side (GAATTTTCTGTATATGGG) of the insert. Transformation of *Escherichia coli* (HB2151) was by electroporation; recombinants were grown in ampicillin; expression was induced with 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (2.5 h, 30 °C); and a periplasmic extract was prepared in 10 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, pH 7.2, 1 M sodium chloride and dialyzed against 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.025% Tween 20.

L-chain Purification—The his₆ tag permitted purification of the recombinant protein by two cycles of chromatography on chelating fast-flow Sepharose (Pharmacia Biotech Inc.) charged with 0.2 M nickel sulfate and equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.025% Tween 20 (equilibration buffer). The column was washed (2 ml/min) successively with equilibration buffer and with 2 M ammonium chloride in equilibration buffer, 50 mM sodium formate, pH 3.8, 0.025% Tween 20 and eluted with 50 mM EDTA in equilibration buffer. Light chain detection was by dot blots for the C-terminal c-myc tag using samples (50 μ l) plated on 0.2- μ m nitrocellulose (BA83, Schleicher & Schuell) in a Bio-Rad blotting apparatus, blocked (2 h) with 5% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline, treated (60 min each) with mouse anti-c-myc antibody (1:500 dilution of ascites; clone 9E10, American Type Culture Collection) and goat anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:1000 dilution; Sigma), and stained with 0.03% (w/v) diaminobenzidine (Sigma) in 0.03% H₂O₂. EDTA fractions containing c-myc-

* This work was supported by National Institutes of Health Grants HL44126 and AI31268 and by a contract with IGEN Inc. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Performed this work in partial fulfillment of the requirements for a Ph.D. degree.

¶ To whom correspondence should be addressed: Eppler Cancer Research Inst., University of Nebraska Medical Center, 600 S. 42nd St., Omaha, NE 68198-6830.

¹ The abbreviations used are: VIP, vasoactive intestinal peptide; L-chain, light chain; IEF, isoelectric focusing; HPLC, high pressure liquid chromatography; MCA, methylcoumarinamide; V_L and V_H, light and heavy chain variable regions, respectively; CDR, complementarity-determining region.

A

pUC119 - GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTT GTT CCT TTC TAT GCG GCC CAG CTCG GCC ATG GCC CAG GTC CAA
 signal peptide SfiI NcoI

CTG CAG GAG CTC GAG ATC AAA CGG GCTG GCC GCA cat cat cat cac cat cac ggg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca
 PstI XhoI Not I poly his c-myc

gaa gag gat ctg aat ggg gcc gca tag - gene3
 Amber

B

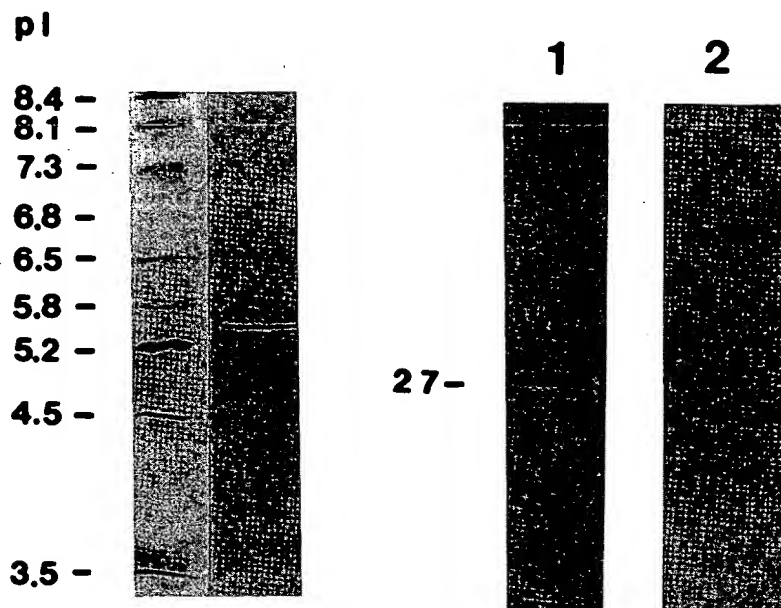


FIG. 1. A, cloning region of pCANTAB5his₆; B, IEF (left) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (right) of the purified recombinant anti-VIP light chain. Shown on the IEF gel are silver-stained pI protein markers (left lane) and the light chain (right lane). Shown on the SDS-polyacrylamide gel are silver-stained (lane 1) and anti-c-myc antibody-stained (lane 2) light chains.

stainable light chain were dialyzed and rechromatographed on chelating Sepharose (bed volume of 10 ml). Light chain expression levels were 1–2 mg/liter of bacterial culture, and the yield of the pure protein was 350 µg/liter. Isoelectric focusing was on Phast IEF gels, pH 3–9, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was on 8–25% Phast acrylamide gels. SDS gels were diffusion-blotted onto nitrocellulose membranes for 30 min and stained with anti-c-myc antibody. The N-terminal amino acid sequence of the recombinant light chain (2.5 µg) adsorbed on a polyvinylidene difluoride membrane (ProSpin cartridge, Applied Biosystems Inc.) was determined by automated Edman degradation as described (7). Anion-exchange chromatography was on a Mono-Q column (Pharmacia Biotech Inc.; 0–1 M NaCl (30 min) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.025% Tween 20), and gel-filtration chromatography was on a Superose 12 column (Pharmacia Biotech Inc.; 0.5 ml/min) (10). Light chain recovered from the gel filtration column (retention time of 28 min) and from the Mono-Q column (elution position at 0.43 M NaCl) was dialyzed against assay diluent prior to determination of hydrolytic activity. Immunoabsorption of the light chain (7.5 µg) was for 17 h (4 °C) in 50 mM Tris-HCl, 100 mM glycine, pH 7.7, 0.025% Tween 20, 0.02% sodium azide with the following antibodies immobilized on Sepharose (3 ml of settled gel): mouse anti-c-myc (clone 9E10), rat anti-mouse κ-chain (Zymed Laboratories, Inc.), and rat anti-mouse IgG₁ (Zymed Laboratories, Inc.). Preparation of immobilized anti-c-myc and the immunoabsorption method were as described (11). The light chains from reduced and alkylated antibody c23.5 and a control nonimmune antibody (from myeloma IgG_{2a}, κ; UPC10, Sigma) were purified in 6 M guanidine hydrochloride and renatured by dialysis as described (7).

VIP Hydrolysis—Synthetic VIP (HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKY-LNSILN-NH₂, peptide content of 81%; Bachem California) was labeled

with ¹²⁵I using chloramine T, and [¹²⁵I-Tyr¹⁰]VIP was separated by reversed-phase HPLC and identified by N-terminal radiosequencing (1, 12). [¹²⁵I-Tyr¹⁰]VIP was treated with the L-chain at 38 °C in 200 µl of 0.05 M Tris-HCl, 0.1 M glycine, pH 7.7, 0.025% Tween 20, 0.1% bovine serum albumin, and peptide hydrolysis was estimated by measuring the radioactivity soluble in 10% trichloroacetic acid (1). Estimates of peptide breakdown by this method are essentially identical to those obtained by reversed-phase HPLC separation of intact and degraded peptide fragments (7). Trypsin from bovine pancreas (3 × crystallized, 3080 units/mg) was from United States Biochemical Corp. Diisopropyl fluorophosphate, aprotinin, iodoacetamide, and pepstatin A were from Sigma.

Peptide-MCA Hydrolysis—Peptide-MCA conjugates (Peptides International Inc.) were treated with the catalyst in 96-well microplates (Microfluor W, Dynatech Laboratories Inc.) in 50 µl of 0.05 M Tris-HCl, 0.1 M glycine, pH 7.7, 0.025% Tween 20 (6 h, 37 °C; λ_{ex} = 370 nm and λ_{em} = 460 nm; Perkin-Elmer LS-50 spectrofluorometer equipped with a plate reader).

Molecular Modeling—A model of the V_L-V_H complex was prepared using AbM™ (Oxford Molecular, Inc.) (13, 14) and minimized by a combination of steepest descent and conjugate gradient methods using DISCOVER (Biosym Technologies). Greater than 98% of the amino acids of the model fell in the allowed regions of a Ramachandran plot. The protocol initially fixed all heavy atoms, followed by gradual relaxation of tethering constraints on the side chains and then relaxation of constraints on the backbone atoms of the CDRs. A mirror image of the catalytic triad of subtilisin (Asp³², His⁶⁴, and Ser²²¹) (15) was fitted to light chain residues Asp¹, Ser²⁸, and His⁹⁸ by superposition of their Cα atoms. Terminal atoms of the antibody side chains were template-forced

TABLE I
Kinetic parameters for VIP and Pro-Phe-Arg-MCA hydrolysis by the recombinant light chain

[¹²⁵I-Tyr¹⁰]VIP (0.15 nM) breakdown rates were estimated by incubation with 5 nM light chain and increasing concentrations of unlabeled VIP (1–2000 nM) for 6 h (37 °C). Pro-Phe-Arg-MCA hydrolysis was estimated by incubation with 0.5 μM light chain and 2.5–100 μM substrate for 7 h (37 °C). Data are fitted to the Michaelis-Menten equation (Enzfitter, Biosoft Elsevier). VIP, His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂.

Catalyst	Substrate	K_m μM	k_{cat} min ⁻¹	k_{cat}/K_m min ⁻¹ μM ⁻¹
L-chain	VIP	0.2×10^{-6}	1.1×10^{-2}	5.5×10^4
L-chain	Pro-Phe-Arg-MCA	11.5×10^{-6}	6.8×10^{-3}	5.9×10^2
Trypsin	VIP	3.8×10^{-4}	1.1×10^3	2.9×10^6
Trypsin	Pro-Phe-Arg-MCA	2.0×10^{-4}	2.6×10^1	1.3×10^6

to their catalytic counterparts and allowed to relax with no constraints on the system. N-terminal Asp¹ was not well aligned with Asp³² of subtilisin, but when all 3 light chain residues were template-forced to the catalytic triad of the enzyme followed by relaxation of the structure, good superposition was evident. The manipulations did not unduly perturb the light chain backbone conformation, and the conformations of the canonical CDRs (L1 and L3) were retained (16).

RESULTS AND DISCUSSION

Catalytic Activity of the Light Chain—Polymerase chain reaction-amplified light chain cDNA was inserted into a bacterial expression vector, and the recombinant protein was purified by means of its affinity for metals (Fig. 1). The purified light chain preparations contained a single protein migrating with an apparent pI between 5.2 and 5.8 on isoelectric focusing gels. The molecular mass of the light chain was 27 kDa as assessed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the protein was immunoblotted by anti-light chain and anti-c-myc antibodies (the recombinant protein contains a 10-residue c-myc tag). N-terminal sequencing of the purified protein yielded a single peptide sequence (Asp-Val-Val-Met-Thr) corresponding to the previously reported sequence of the light chain purified from reduced and alkylated antibody c23.5 (7). A linear increase in [¹²⁵I-Tyr¹⁰]VIP hydrolysis was observed (5.3–49.4% available peptide) at increasing recombinant light chain concentrations (1.5–15 nM). The reaction was saturable at increasing substrate concentration, and the initial rates were consistent with Michaelis-Menten kinetics (Table I). The K_m value of the light chain (0.2 μM) was 1900-fold lower than that of trypsin, a nonspecific protease, determined under identical conditions. The kinetic efficiency (k_{cat}/K_m) of light chain-catalyzed VIP hydrolysis is only 53-fold lower than that of trypsin. Treatment of 30 μM nonradioactive VIP with 2 μM light chain for 6 h resulted in 32% peptide hydrolysis estimated using an HPLC assay,² corresponding to 4.8 catalyst turnovers. This value is close to the turnover determined by radiometric analyses.

The specificity of catalysis was examined by screening for hydrolysis of synthetic peptide-MCA conjugates, a reaction accompanied by increased fluorescence due to accumulation of 7-amino-4-methylcoumarin (17). Very slow hydrolysis of some of the single amino acid-MCA conjugates examined (Phe-MCA, Met-MCA, Lys-MCA, and Arg-MCA) was observed (Table II). Hydrolysis of the dipeptide-MCA and tripeptide-MCA substrates was more rapid. The hydrolysis of Pro-Phe-Arg-MCA, a substrate bearing no sequence similarity to VIP, was examined in detail. The light chain recognized this peptide with low af-

TABLE II
Hydrolysis of peptide-MCA substrates by the anti-VIP light chain
Reactions were carried out at 50 μM substrate and 0.5 μM light chain for 24 h (37 °C). Values in parentheses are background reaction rates.

Substrate	Rate F units/24 h
Leu-MCA	<0.6 (2.6)
Ala-MCA	0.9 (3.0)
Met-MCA	3.4 (2.5)
Phe-MCA	4.2 (1.5)
Lys-MCA	4.4 (2.5)
Arg-MCA	6.4 (3.2)
Phe-Arg-MCA ^a	38.4 (5.6)
Arg-Arg-MCA ^a	46.8 (4.0)
Pro-Phe-Arg-MCA	90.3 (2.7)
Val-Leu-Lys-MCA ^b	147.2 (3.1)
Glu-Lys-Lys-MCA ^b	217.8 (2.1)

^a The N terminus was derivatized with a benzoyl group.

^b The N terminus was derivatized with a *t*-butyloxycarbonyl group.

finity (Table I; K_m 57-fold greater than for VIP). The turnover rates (k_{cat}) for Pro-Phe-Arg-MCA and VIP were similar, suggesting that the hydrolytic site does not discriminate between the specific antigen and the nonhomologous substrate at the transition state stabilization step of the reactions. This conclusion assumes a common site to be responsible for hydrolysis of VIP and Pro-Phe-Arg-MCA. The validity of this assumption was proved by demonstration of competitive inhibition of peptidyl-MCA hydrolysis by VIP, the tight-binding alternate substrate (Fig. 2). The apparent K_i (0.33 μM) and K_m (0.2 μM) values for VIP were in the same range, suggesting that inhibition of Pro-Phe-Arg-MCA hydrolysis is due to the occupancy of the light chain-binding site by VIP. These data indicate a poorly discriminatory substrate-hydrolyzing site located close to or within the VIP-binding site.

In control experiments, the light chain immunoadsorbed with immobilized antibodies to c-myc and antibodies to mouse κ-chain displayed near-complete loss of VIP hydrolyzing activity (11 and 15% of the activity observed by immunoadsorption with irrelevant anti-IgG₁ antibody, respectively). The specific activities of the recombinant protein after sequential chromatography on a metal affinity column, a Mono-Q anion-exchange column (elution position at 0.43 M NaCl), and a Superose 12 gel-filtration column (retention time of 28 min) were 22.8, 24.8, and 25.87 cpm × 10³/h/μg of light chain with [¹²⁵I-Tyr¹⁰]VIP as substrate and 4.8, 4.5, and 4.3 ΔF/h/μg of light chain with Pro-Phe-Arg-MCA as substrate, respectively, where ΔF denotes the increase in fluorescence in arbitrary units relative to substrate incubated without catalyst. The constancy of these specific activity values suggests catalyst homogeneity. Metal affinity-purified fractions of periplasmic extracts of bacteria infected with the control cloning vector without the light chain insert did not display catalytic activity. These data, taken together with the functional specificity of the catalyst preparations for VIP, show that the hydrolytic activities are due to the recombinant light chain.

The light chain was also prepared from reduced and alkylated antibody c23.5 in denaturing solvent and renatured by dialysis against assay diluent (7). The levels of VIP hydrolyzing activity of several preparations were observed to vary as a function of the concentration at which the light chain was held during the renaturation step (18), suggesting a negative influence of protein aggregation on assumption of a catalytically active conformation. This type of activity variability was not observed in three recombinant light chain preparations, each of which was purified under nondenaturing conditions. Kinetic parameters for the reduced and alkylated light chain renatured at 0.16 μM were as follows: $K_m = 1.9 \pm 0.3$ μM and $k_{cat} = 1.3 \pm 0.1$

² Reversed-phase HPLC was as described (10). Peptide hydrolysis was estimated based on the decrease in area of the intact VIP peak eluted at 46% acetonitrile. Product identities are to be reported elsewhere.

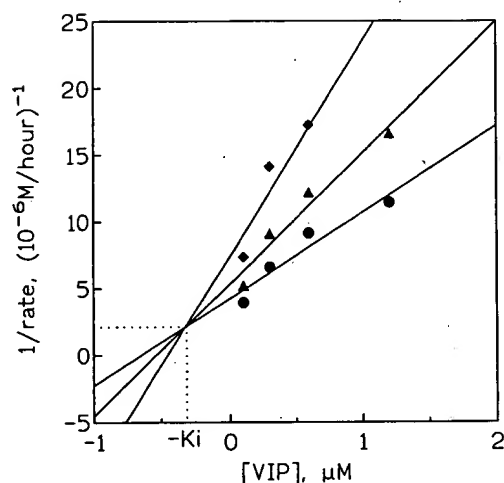


FIG. 2. Inhibition of light chain-catalyzed hydrolysis of Pro-Phe-Arg-MCA by VIP. Reaction rates were measured at 1 μ M light chain and 25 (\bullet), 15 (\blacktriangle), or 7.5 (\blacklozenge) μ M substrate. Other conditions were as described in the legend to Table I.

1
GAT GTG GTG ATG ACG CAG ACT CCA CTC ACT TTG TCG GTT ACC ATT
asp val val met thr gln thr pro leu thr leu ser val thr ile
1

46
GGA CAA CCA GCC TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA
gly gln pro ala ser ile ser cys lys ser ser gln ser leu leu
16

91
CAT ACT GAT GGA AAG ACA TAT TTG ATT TGG TTG TTA CAG AGG CCA
his thr asp gly lys thr thr leu ile trp leu leu gln arg pro
31

136
GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC TAT CTG GTG TCT AAA CTG GAC
gly gln ser pro lys arg leu ile tyr leu val ser lys leu asp
46

181
TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT
ser gly val pro asp arg phe thr gly ser gly ser gly thr asp
61

226
TTC ACA CTG AAA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT
phe thr leu lys ile ser arg val glu ala glu asp leu gly val
76

271
TAT TAT TGC TGG CAA GGT ACA CAT TTT CCT CAG ACG TTC GGT GGA
tyr tyr cys trp gln gly thr his phe pro gln thr phe gly gly
91

316
GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA
gly thr lys leu glu ile lys
106

FIG. 3. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the anti-VIP light chain inserted in pCANTAB5his₈ (GenBank™ accession number L34775). Complementarity-determining regions are underlined.

$\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. A nonimmune light chain (from myeloma IgG_{2a}, κ ; UPC10, Sigma) purified and renatured under identical conditions was devoid of catalytic activity.

Molecular Model of the Light Chain—Inspection of the nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of the V_L region (Fig. 3) showed it to be a member of κ -chain family II (19). A V_L-V_H dimer model of antibody c23.5 was produced, the V_L domain of which is shown in Fig. 4. This model is relevant to the properties of the light chain since dilute solutions of monoclonal c23.5 IgG preparations express a weak peptidolytic activity (5); the recombinant single chain V_L-V_H construct (F_v) of this antibody also expresses catalytic activity³; and the structure of V_L domains is often largely independent of the mode of

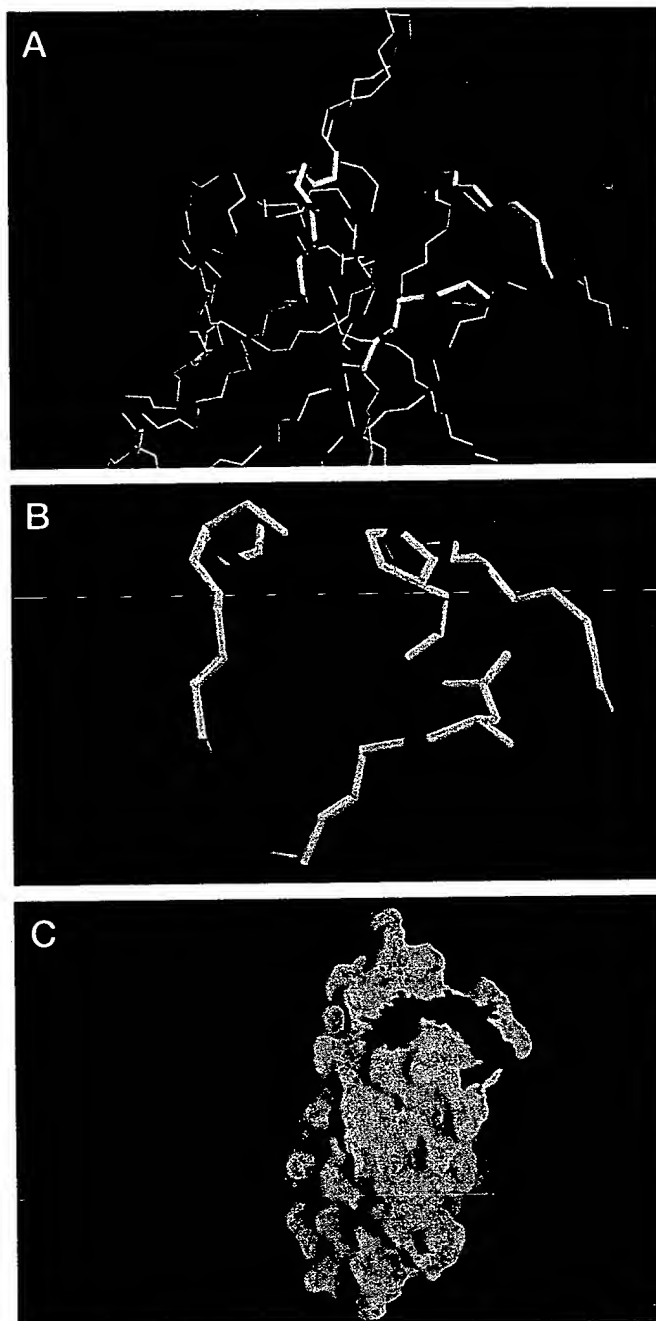


FIG. 4. Rendered images of the anti-VIP V_L region after template forcing and relaxation of the structure. A shows a backbone trace of the light chain region of the modeled V_L region before (green) and after (white) template forcing and relaxation. Where the backbones did not differ, a single color with a reduced thickness for the backbone is shown. B illustrates the similar geometry of light chain residues Asp¹, Ser²⁸, and His⁹⁸ (white) to the catalytic triad (red) of subtilisin after template forcing of the structure. C is a rendered image of the V_L region angled at $\sim 30^\circ$ to the plane of the combining site, showing the Asp¹ (red), Ser²⁸ (green), and His⁹⁸ (blue) triad. A-C were produced using MOLSCRIPT (27), RASTER3D (28), and GRASP (29), respectively. The nucleotide sequence of the V_H region (clone c23.5) has been deposited in GenBank™ (accession number pending).

association with V_H domains, even where the intersubunit contacts are not conserved between the light and heavy domains (20). The model revealed two potential catalytic sites with a composition similar to that found in the catalytic triad of many serine proteases (an Asp, a Ser, and a His located in a hydrophobic pocket). The first site (Fig. 4B) contains the N-terminal aspartic acid residue of the light chain (Asp¹), a serine from

³ S. Paul and Q.-S. Gao, unpublished data.

CDR1 (Ser²⁸), and a histidine from CDR3 (His⁹⁸). The C α distance geometries and side chain orientations of these residues were similar to those of their counterparts from the catalytic triad of subtilisin (15). The second site involved residues from CDR1 (Ser²⁸, His³¹, and Asp³³). Template forcing of this site to the catalytic geometry of subtilisin disrupted the canonical structure of CDR1, rendering it a less likely location for catalysis. The likelihood of a serine protease-like mechanism is supported by observations of reduced light chain-catalyzed VIP hydrolysis in the presence of the serine protease inhibitors diisopropyl fluorophosphate (200 μ M) and aprotinin (0.75 μ M) (by 84 and 89%, respectively; assayed as described in the legend to Table I). Inhibitors of other classes of proteases, including iodoacetamide (2 mM), EDTA (2 mM), and pepstatin A (500 μ M), were essentially without effect on the activity. These observations suggest that where efficient catalysis of energetically difficult reactions by antibodies is seen, known enzymatic mechanisms that have evolved over many millions of years will be reproduced.

Conclusion—Polyclonal autoantibody light chains display catalytic activity (21). Some light chains secreted by B-lymphocyte tumors express sequence similarities to serine proteases (22). Light chains contribute a significant proportion of the antibody-antigen contact surface (23), and they can independently bind antigens (7, 24). The light chain described here was raised by immunization with the substrate (VIP), indicating that synthesis of catalytic sites is an intrinsic component of the immune response to polypeptide antigens. The distinctive property of the light chain not shared by proteolytic enzymes is an ability to strongly recognize the ground state of VIP. The lower K_m of the light chain for VIP compared with the nonhomologous substrate is consistent with the clonal selection theory, i.e. the light chain has been selected during the immune response to VIP because it recognizes the inciting antigen with comparatively high affinity. Polypeptide binding by antibodies can involve contacts at >15 residues in each molecule (23), but most of the binding energy appears to derive from a subset of these contacts (25, 26). In the case of a catalyst, such a multiplicity of contacts makes it possible that distinct subsites play important roles in the binding and hydrolyzing functions. This is supported by hydrolysis of Pro-Phe-Arg-MCA by the anti-VIP light chain, a substrate unrelated in sequence to VIP. The turnover rate for VIP is no higher than for the nonhomologous substrate, pointing to the possibility of an independent evolution of the hydrolytic and antigen binding functions. Even so, it is clear

that the hydrolytic function is preserved in the affinity-matured light chain. Therefore, the immune system should prove a rich source of catalysts that combine a hydrolytic function with strong substrate binding affinity.

Acknowledgments—We are grateful to John McCafferty and Rodger Smith for providing the expression vector and for helpful suggestions in cDNA cloning.

REFERENCES

- Paul, S., Volle, D. J., Beach, C. M., Johnson, D. R., Powell, M. J. & Massey, R. J. (1989) *Science* **244**, 1158–1162
- Shuster, A. M., Gololobov, G. V., Kvashuk, O. A., Bogomolova, A. E., Smirnov, I. V. & Gabibov, A. G. (1992) *Science* **256**, 665–667
- Tonegawa, S. (1983) *Nature* **302**, 575–581
- Tramontano, A., Janda, K. D. & Lerner, R. A. (1986) *Science* **234**, 1556–1573
- Paul, S., Sun, M., Mody, R., Tewary, H. K., Mehrotra, S., Gianferrara, T., Meldal, M. & Tramontano, A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13142–13145
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156–159
- Sun, M., Li, L., Gao, Q.-S. & Paul, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 734–738
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P. & Winter, G. (1989) *Nucleic Acids Res.* **19**, 4133–4137
- McCafferty, J., Fitzgerald, K. J., Earnshaw, J., Chiswell, D. J., Link, J., Smith, R. & Kenton, J. (1994) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **47**, 157–173
- Paul, S., Sun, M., Mody, B., Eklund, S. H., Beach, C. M., Massey, R. J. & Hamel, F. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16128–16134
- Paul, S., Volle, D. J. & Sun, M. (1990) *J. Immunol.* **145**, 1196–1199
- Mody, R. K., Tramontano, A. & Paul, S. (1994) *Int. J. Pept. Protein Res.* **44**, 441–447
- Martin, A. C. R., Cheetham, J. C. & Rees, A. R. (1991) *Methods Enzymol.* **203**, 121–153
- Pedersen, J., Searle, S., Henry, A. & Rees, A. R. (1992) *ImmunoMethods* **1**, 126–136
- Bode, W., Papamokos, E. & Musil, D. (1987) *Eur. J. Biochem.* **166**, 673–692
- Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987) *J. Mol. Biol.* **196**, 901–917
- Sarath, G., De La Motte, R. S. & Wagner, F. W. (1989) in *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, (Beynon, R. J., and Bond, J. S., eds) pp. 25–55, IRL Press, Oxford
- Sun, M., Li, L., Gao, Q.-S. & Paul, S. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, in press
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. & Foeller, C. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., National Institutes of Health Publication 91-3242, U. S. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD
- Steipe, B., Pluckthün, A. & Huber, R. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 739–753
- Sun, M., Mody, B., Eklund, S. H. & Paul, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15571–15574
- Erhan, S. & Grell, L. D. (1974) *Nature* **251**, 353–355
- Davies, D. R., Padlan, E. A. & Sheriff, S. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439–474
- Mahana, W., Jacquemart, F. & Ermonval, M. (1994) *Scand. J. Immunol.* **39**, 107–110
- Novotny, J., Brucoleri, R. E. & Saul, F. A. (1989) *Biochemistry* **28**, 4735–4749
- Kelley, R. F. & O'Connell, M. P. (1993) *Biochemistry* **32**, 6828–6835
- Kraulis, P. J. (1991) *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946–950
- Bacon, D. J. & Anderson, W. F. (1988) *J. Mol. Graph.* **6**, 219–220
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. & Honig, B. (1993) *Biophys. J.* **64**, A166
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467

Identification of Novel Transmembrane Gene Sequence and Its Use for Cell-Surface Targeting of β Subunit of Human Chorionic Gonadotropin

ANUSHREE GUPTA,¹ S. CHANDRASEKHAR,^{1,2} RAHUL PAL,¹ G.P. TALWAR,¹ and OM SINGH¹

ABSTRACT

We identified a 685-nucleotide gene fragment that codes for the transmembrane and cytoplasmic domains of glycoprotein of the LEP strain rabies virus and carried out experiments designed to express a novel fusion protein on the cell surface. The cDNA encoding the membrane anchor sequence was fused in the correct reading frame to the 3' end of the cDNA encoding the β subunit of human chorionic gonadotropin (β hCG), a secretory glycoprotein that is used as an antigen for a contraceptive vaccine being developed in our laboratory. The fusion gene cassette was placed under the control of a vaccinia virus early promoter and cloned in a host-restricted fowlpox viral vector. The recombinants, when used to infect mammalian cells that do not allow the replication of fowlpox virus, expressed the N-terminal 135 amino acid residues of β hCG anchored in the cell membrane by the 75-amino acid C-terminal sequence derived from rabies virus glycoprotein. This hybrid protein is correctly processed post-translationally and transported efficiently to the plasma membrane of non-permissive cells such that the anchored β hCG molecule retains the correctly folded native antigenic epitope(s).

INTRODUCTION

HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN (hCG) is a member of a family of glycoprotein hormones that also includes luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), and thyroid-stimulating hormone (TSH). Each hormone is a heterodimer consisting of a common α -subunit and a hormone-specific β subunit, encoded by separate genes.

Human chorionic gonadotropin is an early signal of pregnancy. It stimulates the corpus luteum to produce progesterone until the placenta starts producing this steroid. Because of the critical role played by hCG in the establishment and maintenance of early pregnancy, it has been considered a target for a contraceptive vaccine. A prototype vaccine based on β subunit of hCG (β hCG) eliciting bionutralizing antibodies (Singh *et al.*, 1989; Pat *et al.*, 1990) has completed probing efficacy trials (Talwar *et al.*, 1994), demonstrating the feasibility of the

approach. The hormonal subunit was required to be chemically linked to protein carrier molecules such as tetanus toxoid (TT) or diphtheria toxoid (DT) to overcome the immunologic tolerance to the "self" molecule. However, chemical linkage of β hCG can result in batch-to-batch variation.

In order to obtain a well-defined fusion protein, we had earlier constructed a recombinant vaccinia virus capable of expressing cell-surface-anchored β hCG in an immunogenic form (Srinivasan *et al.*, 1995). The use of vaccinia as a live viral vector has limitations, however, including its potential for spreading from vaccinees to unintended subjects and possible complications associated with its use, especially in immunocompromised individuals. The present study was undertaken to investigate the feasibility of producing β hCG in a mammalian cell line using fowlpox vector. Because fowlpox virus (FPV) does not replicate in non-avian hosts, this approach would avoid the above-mentioned concerns. Fowlpox recombinants have in

¹National Institute of Immunology, New Delhi 110067, India.

²Present address: Division of Surgical Oncology, Massachusetts General Hospital, 100 Blossom Street, Boston, MA 02114.

the past been used to express rabies glycoprotein (Taylor *et al.*, 1988) and the *env* or *gag-pol* polypeptides of simian immunodeficiency virus (Jenkins *et al.*, 1991) in mammalian cells, in which FPV infection is abortive. In this paper, we report on the identification of a sequence representing the transmembrane and cytoplasmic domains of LEP strain rabies virus glycoprotein (RGL). Using this anchor sequence, a recombinant FPV was constructed that expressed β hCG on the cell surface. The hormonal subunit attained an immunologically active conformation similar to that seen in the native molecule.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids, virus, and primary cell cultures

The FPV (CEVA strain) and the FPV transfer vector pBHCX402 were kindly provided by Dr. Deoki Tripathy, University of Illinois, USA. Plasmid Bluescript KS⁻ used for intermediate cloning stages was obtained from Stratagene. The CV1 monkey cells (obtained from the National Centre for Cell Science, Pune, India) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone Labs Inc.). Primary chick embryo fibroblasts were isolated from pathogen-free embryonated eggs (Government Poultry Farm, Satbari, New Delhi). After removal of hair and other cornified tissues (claws, beak, eyes) and viscera, 10- to 12-day-old embryos were trypsinized according to Solomon (1975). The disaggregated cells were maintained in Medium 199 supplemented with 10% FBS and antibiotics. Restriction enzymes were obtained from Boehringer Mannheim, Germany; other fine chemicals, media, and antibiotics were from Sigma Chemical Co. or GIBCO BRL. Enzymatic manipulations of DNA were performed as described by Maniatis *et al.* (1982).

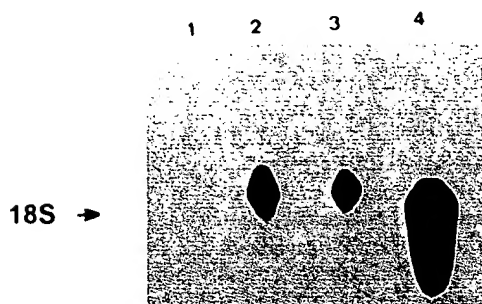


FIG. 1. Northern blot hybridization. Total RNA was isolated from mouse brain tissue infected with the LEP strain of rabies virus. The figure shows total RNA (lane 3), poly(A)⁺ RNA (lane 2), and poly(A)⁻ RNA (lane 1). The DNA of rabies glycoprotein of CVS strain (RabGP) was used as control (lane 4). The blot was probed with 1.65-kb RabGP DNA labeled with [α^{32} P]dCTP by random priming (Boehringer Mannheim, Germany). The autoradiograph shows a distinct band around 18S, corresponding to an RNA size of approximately 2.0 kb. The relative concentration of the glycoprotein message is about 1:1000 compared with the concentration of RabGP DNA.

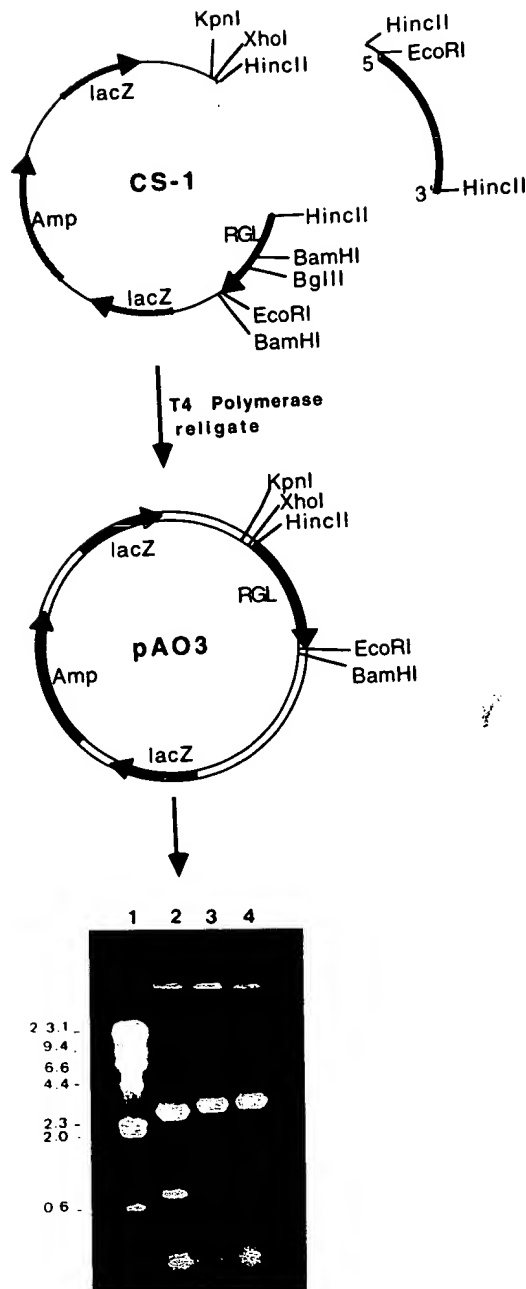


FIG. 2. Cloning of the RGL transmembrane domain. Subclone CS1 containing the RGL gene fragment (nt 521–2042) in the pBluescript KS⁻ vector was cut with *HincII*. The vector-linked 3' gene fragment (nt 1358–2042) was eluted from the gel and religated with the regeneration of the *HincII* site to give rise to pAO3. The presence of a 685-bp fragment coding for the membrane anchor sequence of rabies glycoprotein was confirmed by restriction analysis. Lane 1 = lambda *HindIII* marker; lane 2 = *EcoRI* + *HincII* digest; lane 3 = *EcoRI* + *BamHI* digest; lane 4 = *EcoRI* + *BglII* digest. When cut with restriction enzymes *EcoRI* and *HincII*, the 685-bp insert is released. Cutting with *EcoRI* and *BamHI* releases a 388-bp fragment comprised predominantly of 3' UTR, while a 274-bp fragment is similarly released on digestion with *EcoRI* and *BglII*.

Isolation of RNA and Northern blot analysis

Total RNA of LEP strain rabies virus was isolated from the brain tissue of mice infected with the virus following the procedure of Chirgwin *et al.* (1979). Consistently, about 2 mg of RNA per gram of brain tissue could be obtained. The poly(A)⁺ RNA was isolated using a oligo(dT) cellulose gravity column (New England Biolabs, USA). Northern blotting was performed after electrophoresis in 1% formaldehyde-containing agarose gel (Sambrook *et al.*, 1989). The filters were hybridized in a solution containing 6× SSC, 50% formamide, 5× Denhardt's solution, and 0.5% SDS for 24 h at 42°C with ³²P-labeled RabGP 2 × 10⁶ cpm/ml as probe. (The gene was a kind gift from Dr. J.J. Esposito, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta). Final washing conditions were 0.2× SSC, 0.5% SDS at 65°C for 60 min.

Isolation of RGL cDNA and sequence analysis

The cDNA was synthesized from the poly(A)⁺ RNA and oligo(dT) primer using the cDNA synthesis kit (Amersham, UK) according to the manufacturer's instructions. The blunt-ended cDNA was methylated using *Eco*RI methylase and *Eco*RI linkers (New England Biolabs) added using T4 DNA ligase. The linker-ligated cDNA was then ligated to the *Eco*RI-digested and dephosphorylated λ gt11 arms and packaged using the Giga-pack II extract as described by the manufacturer (Stratagene, USA). The packaged phage cDNA library was screened for the presence of RGL cDNA using ³²P-labeled RabGP DNA as probe. The DNA was isolated from the positive clone and sequenced completely by constructing its subclones. Nucleotide sequencing of double-stranded DNA templates was performed by the chain termination method (Sanger *et al.*, 1977) using Se-

quenase 2.0 (U.S. Biochemicals, USA) and [α ³⁵S]dATP (NEN, USA). Computer homology search of the nucleotide and predicted amino acid sequences were done using the DNASIS software package.

Generation of recombinant FPV

A total of 3 × 10⁶ cells (chick embryo fibroblasts) in a T-25 culture flask were infected with wild-type FPV at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 pfu/cell. Transfection was then carried out with 20 μ g of DNA (recombinant plasmid) using lipofectin. Five days later, fresh cells were infected with crude cell lysates found positive for the expression of β hCG. The recombinant plaques were selected by their blue color in the presence of chromogenic substrate, Blueo-gal (GIBCO BRL, USA).

Immunofluorescence

The CV1 cells grown to confluency were infected with the recombinant or wild-type virus at an MOI of 10 pfu/cell. The cellular location of anchored β hCG was determined 24 h postinfection by indirect immunofluorescence using a β hCG-specific monoclonal antibody. A fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-mouse antibody (Sigma), was employed as the secondary reagent.

Detection and immunoreactivity of β hCG

The CV1 cells were infected with 10 pfu/cell of recombinant FPV. Culture supernatant fluid was harvested 24 h postinfection and cleared of cellular debris by centrifugation at 4000 × g for 10 min. The infected monolayer of cells was

-----1358	GACCTGGGTCTCCGAACTGGGGGAAGTATGTA	1390
-----431	D L G L P N W G K Y V	441
TTAATGATTGCAGGGGCCTTGATTGCCCTGATGTTGATAATTTTCTGATGACATGTTGC		1450
L M I A G A L I A L M L I I F L M T C C		461
AGAAGAGTCAATCGACCAGAATCTTCGCAAGCAGTCTTGGAGAGACAGGGAGAAATGTG		1510
R R V N R P E S S Q S S L G E T G R N V		481
TCAGTCACTTCCCAAAGCGGAAAGTCATATCTTCATGGGAGTCATATAAGAGTGGAGGC		1570
S V T S Q S G K V I S S W E S Y K S G G		501
GAGACCAGACTGTGAAGCCGGTCATCCTTTTGACACTTCAAGTCCCGAGGATAACCTCC		1630
E T R L		505
TCTCGGGTTGGGGGAATCTTGGATCCAGTAGTCCTCCTTGAACCTCCATCCAACAGGG		1690
TAGATTTAAGAGTCATGAGACTTTCATTAATCATCTCAGTTGATCAGACATGGTCGTGTA		1750
GATTCTCATAACACGGGAGATCTTCTAGCAGTTTCAGTGACCAACGGTGCTTTCCTTCTC		1810
CAGGAAGTGATACCGAAGTTGTTGGACAAGCCAAGGGGTGCTTCGGATTACTCTGTGCTT		1870
GGGCACAGAAAGAGGTCGTAGTTTGCCCTTGATAGCAGATTCAACATGAATTAACCTAAG		1930
AAAGCGCATCTGCCTCCCATGAAGGACATAAGCAATAGTTCACAATCATCTTGATCTCA		1990
GTGAAGTGATACATAACTATAAAGGGCTGGGTGATCTAAGCATTTTCAGTCGAG		2042

FIG. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of C-terminal transmembrane and cytoplasmic domains of RGL. The translation termination codon is underlined. The restriction sites for *Bam*HI and *Bgl*II are shown in the 3' UTR (boxed).

scraped out with a rubber policeman and pelleted by centrifugation. The cell pellet was lysed by repeated freeze-thawing followed by sonication. The lysate volume was adjusted to that of the culture supernatant fluid with DMEM. The amounts of the expressed subunit in both fractions (cell pellet and culture supernatant fluid) were quantified by RIA using purified native β hCG as the standard (Singh and Capoor, 1993). The relative affinity of recombinant β hCG for binding to a reference monoclonal antibody was determined by the cold displacement method essentially as described (Singh *et al.*, 1989). Briefly, increasing amounts of β hCG (recombinant or native) were incubated with diluted antibody in the presence of 125 I-hCG at 4°C for 24 h. Bound fractions precipitated by 12.5% PEG 8000 were separated by centrifugation at 1500 \times g for 20 min, and radioactivity was counted in an LKB multi- γ -counter. Association constants of anti-

gen-antibody interaction were computed by nonlinear regression analysis using a computer program (Munson and Rodbard, 1980).

RESULTS

Identification and cloning of RGL gene transmembrane domain

To isolate the cDNA corresponding to the C-terminal transmembrane and cytoplasmic domains, we cloned the gene for RGL from infected mouse brain tissue. Its cDNA was synthesized from the poly(A)⁺ RNA that in turn was isolated from the total RNA (Fig. 1) using oligo(dT) cellulose. The 2042-bp RGL gene codes for a mature protein of 505 amino acids. Sequence alignment and homology search of the C-terminal region of the derived protein was carried out with other known rabies virus glycoprotein sequences. This analysis revealed a hydrophobic region of 22 amino acids (440–461 residues of the mature protein), characteristic of a transmembrane domain, followed by a 44-amino acid cytoplasmic domain. The region has 93.3%, 80%, 81.3%, and 80% identity with the corresponding region of HEP, PV, ERA, and CVS strains, respectively, the overall protein similarity being 96.6%, 92.7%, 91.8%, and 90.0%. Sequence analysis of the 3' end of the gene revealed a convenient restriction site for the enzyme *HincII*, which was

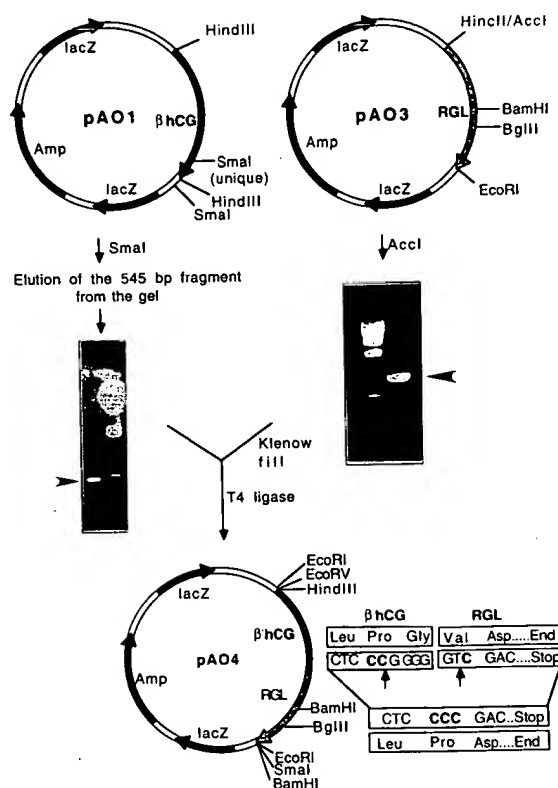


FIG. 4. Construction of chimeric β hCG gene. Plasmid pAO1, containing β hCG gene at the *HindIII* site of the cloning vector pBluescript KS⁻ was digested with *SmaI* to release the gene as a blunt-ended fragment. Because of the presence of an internal *SmaI* site in the gene, 50 bp is removed from the 3' end. The fragment was eluted from the gel and purified. It was then ligated to pAO3 (which contained the transmembrane domain of the rabies glycoprotein gene) that was cut with *AccI* and made blunt ended by Klenow filling. The enzyme *AccI* cut the codon internally (1 bp next to the *HincII* site) in such a way that there was no frameshift on fusion with the blunt-ended β hCG gene fragment.

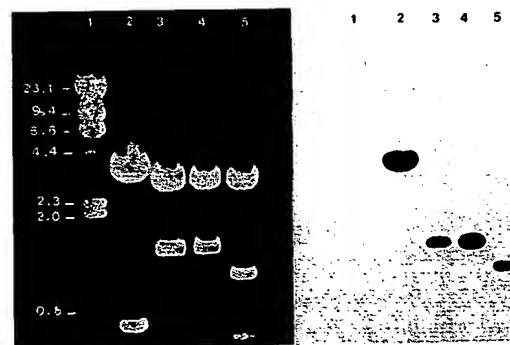


FIG. 5. Characterization of R- β hCG gene cassette in plasmid pAO4. Gel picture (left) showing size of fragments obtained on digestion with various restriction enzymes. Southern blot (right) of the same using [32 P]- β hCG as probe. Lane 1 = lambda *HindIII* marker; lane 2 = *BamHI* digest; lane 3 = *HindIII* + *SmaI* digest; lane 4 = *EcoRI* digest; lane 5 = *EcoRI* + *BglII* digest. The entire fused gene cassette of ≈ 1.2 kb is released on digestion with *HindIII* and *SmaI* (lane 3). As expected, the same insert is released on digestion with *EcoRI* (lane 4). There is one internal *BglII* site in the UTR of the fused gene which truncates it by 274 bp; hence, a band of ≈ 0.9 kb is seen in lane 5. Cutting with *BamHI* releases a small fragment of 388 bp (seen in lane 2 of gel), which does not hybridize with the [32 P]- β hCG probe and is not seen in the autoradiogram accompanying the gel picture. Instead, the portion remaining with the vector and harboring the β hCG gene fragment at the 5' end lights up in lane 2 of the autoradiogram.

used to extract the membrane anchor sequence from a subclone (Fig. 2). The resultant plasmid pAO3 contains 685 bp of the 3' end of the rabies glycoprotein gene, which has a coding region for a 75-amino acid C-terminal anchor sequence and a long untranslated region (UTR) of 460 bp (Fig. 3). The 3' UTR shows the absence of a poly(A)⁺ tract and a consensus termination motif following the coding region, making it a unique feature among the known rabies glycoprotein gene sequences (Aniloinis *et al.*, 1981; Yelverton *et al.*, 1983; Tordo *et al.*, 1986; Mo-

rimoto *et al.*, 1989; Conzelmann *et al.*, 1990). The 3' noncoding region of the RGL gene also has two unique restriction enzyme sites, namely *Bam*HI and *Bgl*II.

Design and construction of chimeric β hCG

The beta subunit of hCG contains 145 amino acids with 12-half-cysteine residues, which form 6 disulfide bonds. The immunodominant antigenic epitopes against which the antibody response is mainly directed lie within the first 111 amino acids (core region) (Talwar *et al.*, 1997). The C-terminal portion (CTP) is poorly antigenic (Ramakrishnan *et al.*, 1979), and those antibodies that are generated do not neutralize the bioactivity of hCG (Dimhofer *et al.*, 1993). Crystal structure data (Lapthorn *et al.*, 1994) show that the CTP lacks a significant secondary structure and that it is not involved in the tertiary structure of the subunit. Therefore, a chimera composed of the RGL membrane anchor genetically fused to the C-terminal end of β hCG would not affect the folding or immunoactivity of the β hCG core.

The overall strategy for the construction of the chimeric gene is shown in Figure 4. The gene for β hCG was cut at a unique *Sma*I site (in the 135th codon of the CTP), and the truncated β hCG gene fragment was cloned at the *Acc*I site of the RGL anchor sequence. This resulted in a plasmid, pAO4, in which the transmembrane and cytoplasmic domains of RGL were fused in-frame to the 135th codon of β hCG. The junction sequence of the two gene fragments is CTC CCC GAC CTG, where a new codon, CCC, replaces the CCG of β hCG and the GTC of the RGL anchor sequence. The recombinant plasmid was characterized by restriction enzyme digestions and Southern hybridization using ³²P-labeled β hCG as probe (Fig. 5). The fusion cassette with the

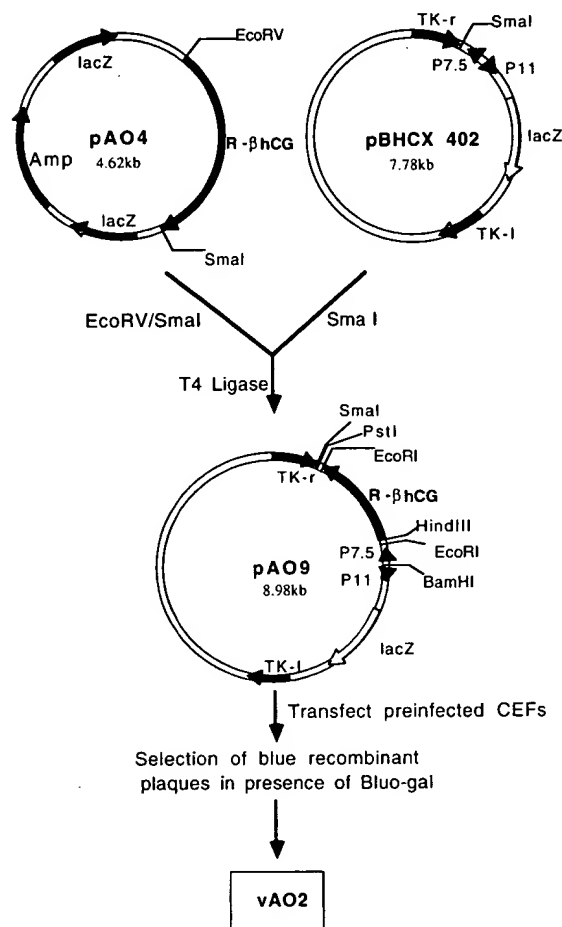


FIG. 6. Generation of recombinant virus vAO2. The fusion cassette R- β hCG was excised from pAO4 by an *Eco*RV/*Sma*I double digest and cloned in a transfer vector pBHCX 402 at its unique *Sma*I site downstream of the vaccinia early promoter P7.5 to obtain the recombinant FPV transfer vector, pAO9. The orientation of the fusion cassette with respect to the P7.5 promoter was ascertained by restriction analysis and Southern blotting followed by hybridization with [³²P] β hCG probe. Segments of the fowlpox TK gene flanking the expression cassette provided for regions of homology, facilitating the insertion of the R- β hCG gene cassette into viral genome. The *E. coli* β -galactosidase gene (*lacZ*) placed under the control of the vaccinia late promoter P11 provided for color selection of the recombinant plaques.

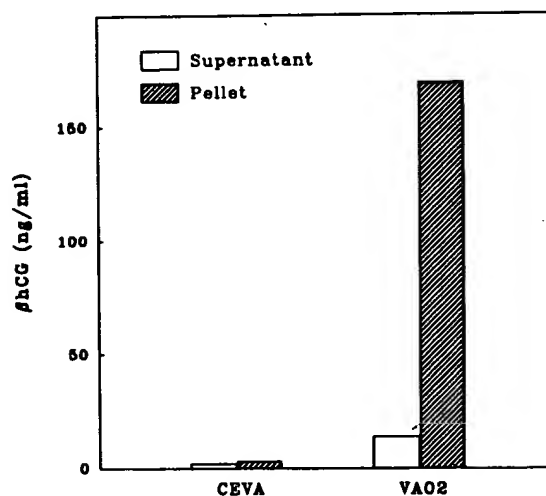


FIG. 7. Comparative levels of expression of free and anchored β hCG. Chick embryo fibroblasts grown in T-25 flasks were infected with either vAO2 or the wild-type (CEVA) virus. The cells were harvested, washed, and lysed 24 h postinfection. The amount of β hCG was estimated in the culture supernatant fluid and lysed cell pellet by competitive RIA.

initiation codon of β hCG and the termination codon of the RGL anchor sequence was placed under the control of a vaccinia virus 7.5 early promoter and inserted in the thymidine kinase locus of the FPV genome by homologous recombination to generate the recombinant virus vAO2 (Fig. 6).

Expression and immunoactivity of membrane-anchored β hCG

The beta subunit of hCG is heavily glycosylated, containing two N-linked and four O-linked carbohydrates. We therefore opted for expression in a mammalian system. Cells of monkey origin (CV1) were infected with the FPV recombinant vAO2. The virus was expected to encode the entire β hCG protein precursor with an additional 75 amino acids of the RGL anchor sequence appended to its C-terminus. The amounts of fusion protein expressed were determined in terms of β hCG equivalent by competitive RIA employing a β hCG-specific monoclonal antibody. As shown in Figure 7, the amount of fusion protein secreted into the medium was very low; most of the expressed β hCG was found anchored to the cellular membrane. The total amount of β hCG expressed was 540 ng/ml. The expression levels in various mammalian systems, as previously reported, have been of similar order; an SV40-based expression system yielded about 240 ng/ml (Reddy *et al.*, 1985), and a vaccinia recombinant, with wide host range, expressed 1600 ng/ml (Srinivasan *et al.*, 1995).

The recombinant FPV made from this construct was then tested for its ability to express anchored β hCG on the cell surface. Indirect immunofluorescence demonstrated expression of the fusion protein on the membrane of the infected mammalian cells (Fig. 8). This result indicates that the glycoprotein β hCG, which is normally secreted, undergoes normal processing and transport through the intracellular pathway and is targeted to the plasma membrane because of the RGL transmembrane sequence. Cells infected with the wild-type virus, which served as negative controls, did not show any fluorescence. The immunoreactivity of membrane-anchored β hCG was compared with the native hormonal subunit in a competitive binding assay. Scatchard analysis (Fig. 9) revealed that the binding affinities of the reference monoclonal antibody for native β hCG and FPV-expressed recombinant β hCG were of the same order ($K_a = 4.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ and $4.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ respectively), indicating that the expressed β hCG folds to recreate the immunologic integrity of the native molecule.

DISCUSSION

Here, we describe identification of a gene sequence encoding transmembrane and cytoplasmic domains of the glycoprotein of the LEP strain of rabies virus and construction and expression of a novel fusion protein composed of the newly identified 75-amino acid membrane anchor domain linked to 135 amino acids of a secretory protein, β hCG. The chimeric protein is transported effectively to the plasma membrane of nonpermissive mammalian cells infected with recombinant FPV.

The fusion gene cassette was designed by fusing the DNA encoding the RGL transmembrane and cytoplasmic domains to the 3'-end of DNA encoding β hCG and was inserted into the FPV genome by homologous recombination. The three-dimensional structure of β hCG has revealed that a unique cystine knot motif (formed by three disulfide bonds) largely determines the peptide folds of β hCG core, whereas the C-terminal 34 residues adopt a poorly ordered flexible structure (Lapthorn *et al.*, 1994). The β hCG-specific monoclonal antibody used in this study is capable of bionutralizing hCG and recognizes a discontinuous determinant on the β hCG core region that dominates the immune response in humans (Talwar *et al.*, 1997). Discontinuous antigenic epitopes are by their nature highly dependent on the correct folding and conformation of the molecule. In contrast, epitopes on β hCG-CTP region are linear. The synthesis of recombinant β hCG with antibody binding affinity similar to that of the native molecule indicates that the fused β hCG folds properly and forms the correct disulfide pairings to recreate the native epitopes. The RGL C-terminal membrane anchor and cytoplasmic domains thus did not interfere with folding of β hCG. The CTP served as a natural linker for the chimeric protein. Its highly flexible conformation is in fact advantageous for cloning purposes. The C-terminal 24 amino acid residues (last 10 being deleted by the cloning strategy employed) were more than adequate to link the anchor sequence without placing any constraint on the folding of the β hCG subunit. The beta subunit of hCG has two N-linked and four O-linked glycosylation sites. The O-linked carbohydrates, located on the C-terminal extension, are responsible for longer circulatory half-life of the hormone (Matzuk *et al.*, 1990), whereas the N-linked carbohydrates are required for proper folding of β hCG (Matzuk and Boime, 1988). These structures may facilitate folding by preventing aggregation (Huth *et al.*, 1994). Expression of immunoreactive β hCG in CV1 cells in the present study is suggestive of correct glycosylation of the expressed molecule.

Our results show that the vaccinia virus 7.5 early promoter elements function efficiently in FPV recombinants. This finding is consistent with the results of other studies showing that the use of promoters of fowlpox origin is not obligatory in recombinant FPV constructs (Boyle and Coupar, 1988) or even in transient assays (Tripathy and Wittek, 1990) and that temporal regulation and correct RNA initiation of genes placed downstream of heterologous promoters are maintained (Prideaux *et al.*, 1990). Early poxvirus genes signal transcriptional termination 20 to 50 nt downstream of TTTTNT sequences in the noncoding strand (Yuen and Moss, 1987; Shuman and Moss, 1988). The present study demonstrates that the cryptic termination motif of the RGL gene is recognized, although an earlier study had suggested that alteration of the cryptic termination sequence may be required for efficient expression when an early vaccinia promoter was employed (Earl *et al.*, 1990).

The anchor sequence targeted β hCG, a secretory protein, in immunoactive form on the membrane surface of nonpermissive cells transfected by a host-restricted recombinant FPV. Earlier studies have showed that secretory proteins can be anchored to the cellular membrane by the addition of transmembrane and cytoplasmic domains derived from vesicular stomatitis virus glycoprotein (Guan *et al.*, 1988), influenza virus hemagglutinin

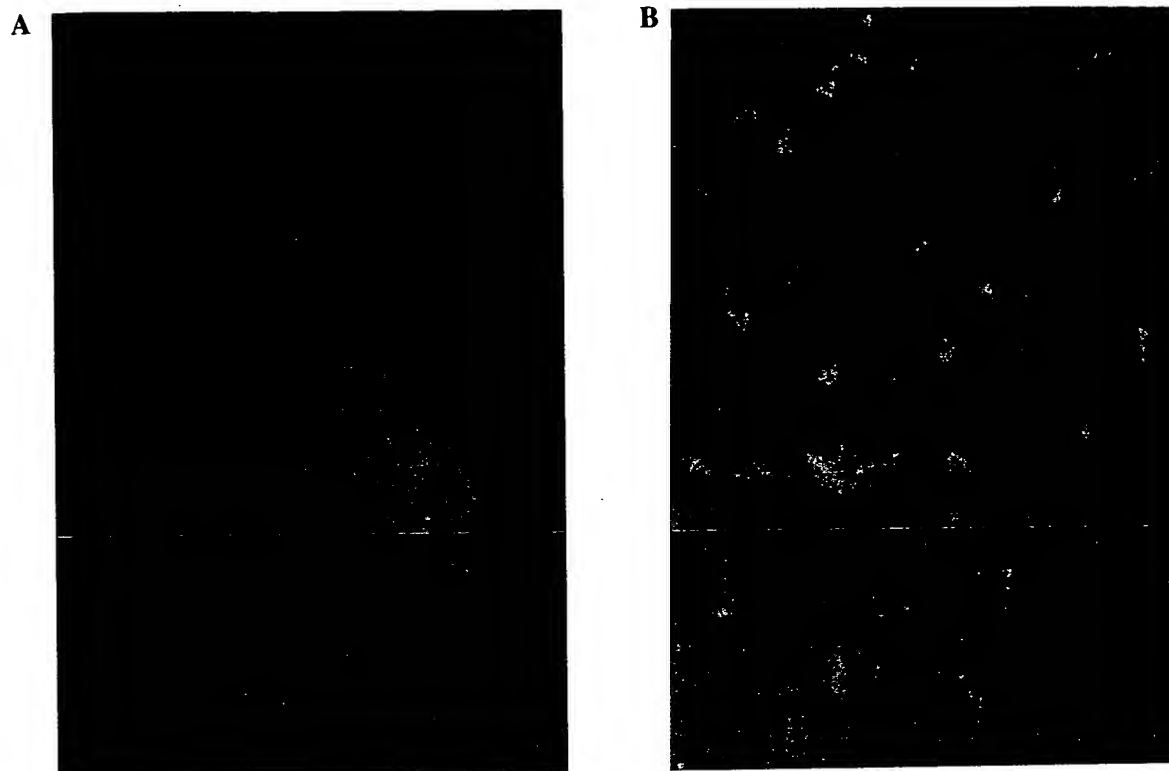


FIG. 8. Cell-surface localization of β hCG. Expression of anchored β hCG on the membrane surface of mammalian (CV1) cells was demonstrated by indirect immunofluorescence with an anti- β hCG-specific monoclonal antibody as the primary antibody and goat anti-mouse antibody conjugated to FITC as the secondary antibody. The CV1 cells were infected with (A) vAO2 and (B) wild-type FPV at an MOI of 10 pfu/cell for 24 h. Distinct surface staining can be seen on cells infected with recombinant virus as opposed to those infected with wild-type virus.

(Andrew *et al.*, 1990), and immunoglobulin (Reddy *et al.*, 1992). N-Linked glycosylation may be important for targeting an anchored molecule to the membrane surface (Guan *et al.*, 1985); the anchored rat growth hormone, which is otherwise targeted to the Golgi complex, is expressed on the cell surface

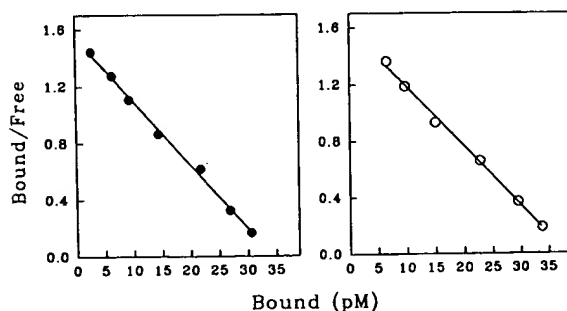


FIG. 9. Scatchard analysis of displacement curves with native (●) and recombinant (○) β hCG. Slopes indicate the binding affinity (association constants, K_d) of the native and recombinant β hCG with the reference monoclonal antibody.

when N-linked oligosaccharides are added to this normally nonglycosylated hormone. The presence of one of two N-linked carbohydrates has been shown to be required for surface localization of α hCG (Guan *et al.*, 1988). The present study indicates that the extent and nature of glycosylation in the fowlpox system is adequate to permit surface expression of recombinant β hCG. The presence of N-linked oligosaccharides may facilitate folding by preventing aggregation, and proper folding may be required for protein transport to the cell surface.

In a previous study, it was demonstrated that β hCG expressed on the membrane surface of cells infected with recombinant vaccinia virus elicited a high anti-hCG antibody response, whereas the virus expressing a secretory form of β hCG generated little or no response (Srinivasan *et al.*, 1995). This result implies that the anchor sequence acts as a carrier for β hCG, as linkage with a carrier overcomes immunologic tolerance and induces an antibody response to β hCG, not only in experimental animals but also in humans (Talwar *et al.*, 1994). In addition, surface expression may improve the presentation of chimeric β hCG to the immune system.

The FPV recombinant described here has the desired property of causing expression of immunoactive chimeric β hCG on

the surface of nonpermissive mammalian cells. In view of their abortive infection, such vectors avoid the safety concerns associated with vaccinia virus and are therefore of potential interest for the development of a safe contraceptive vaccine based on β hCG.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Department of Biotechnology, Government of India, and the International Development Research Centre (IDRC) of Canada. AG was a recipient of research fellowships from the Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), Government of India.

REFERENCES

- ANDREW, M.E., BOYLE, D.B., WHITFIELD, P.L., LOCKETT, L.J., ANTHONY, I.D., BELLAMY, A.R., and BOTH, G.W. (1990). The immunogenicity of VP7, a rotavirus antigen resident in the endoplasmic reticulum, is enhanced by cell surface expression. *J. Virol.* **64**, 4776-4783.
- ANILOINIS, A., WUNNER, W.H., and CURTIS, P.J. (1981). Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature* **294**, 275-278.
- BOYLE, D.B., and COUPAR, B.E.H. (1988). Construction of recombinant fowlpox viruses as vectors for poultry vaccines. *Virus Res.* **10**, 343-356.
- CHIRGWIN, J.M., PRZYBYLA, A.E., McDONALD, R.J., and RUTTER, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.
- CONZELMANN, K.K., COX, J.H., SCHNEIDER, L.G., and THEIL, H.G. (1990). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* **175**, 485-499.
- DIRNHOFER, S., KLIEBER, R., LEEUW, R.D., BIDART, J.M., MERZ, W.E., WICK, G., and BERGER, P. (1993). Functional and immunological relevance of the COOH-terminal extension of human chorionic gonadotropin β : implications for the WHO birth control vaccine. *FASEB J.* **7**, 1381-1385.
- EARL, P.L., HÜGIN, A.W., and MOSS, B. (1990). Removal of cryptic poxvirus transcription termination signals from the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene enhances expression and immunogenicity of a recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* **64**, 2448-2451.
- GUAN, J.L., CAO, H., and ROSE, J.K. (1988). Cell-surface expression of a membrane-anchored form of the human chorionic gonadotropin α -subunit. *J. Biol. Chem.* **263**, 5306-5313.
- GUAN, J., MACHAMER, C.E., and ROSE, J.K. (1985). Glycosylation allows cell-surface transport of an anchored secretory protein. *Cell* **37**, 779-787.
- HUTH, J.R., NORTON, S.E., LOCKRIDGE, O., SHIKONE, T., HSUEH, A.J.W., and RUDDON, R.W. (1994). Bacterial expression and in vitro folding of the β -subunit of human chorionic gonadotropin (hCG β) and functional assembly of recombinant hCG β with hCG α . *Endocrinology* **135**, 911-918.
- JENKINS, S., GRITZ, L., FEDOR, C.H., O'NEIL, E.M., COHEN, L.K., and PANICALI, D.L. (1991). Formation of lentivirus particles by mammalian cells infected with recombinant fowlpox virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**, 991-998.
- LAPTHORN, A.J., HARRIS, D.C., LITTLEJOHN, A., LUSTBADER, J.W., CANFIELD, R.E., MACHIN, K.J., MORGAN, F.J., and ISAACS, N.W. (1994). Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* **369**, 455-461.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., and SAMBROOK, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- MATZUK, M.M., HSUEH, A.J.W., LAPOLT, P., TSAFRIRI, A., KEENE, J.L., and BOIME, I. (1990). The biological role of the carboxyl terminal extension of human chorionic gonadotropin β -subunit. *Endocrinology* **126**, 376-383.
- MATZUK, M.M., and BOIME, I. (1988). Site-specific mutagenesis defines the intracellular role of the asparagine-linked oligosaccharides of chorionic gonadotropin β -subunit. *J. Biol. Chem.* **263**, 17106-17111.
- MORIMOTO, M., OHKUBO, A., and KAWAI, A. (1989). Structure and transcription of the glycoprotein gene of attenuated HEP-Flury strain of rabies. *Virology* **173**, 465-477.
- MUNSON, P.J., and ROBBARD, D. (1980). Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. *Anal. Biochem.* **107**, 220-239.
- PAL, R., SINGH, O., RAO, L.V., and TALWAR, G.P. (1990). Bionutralization capacity of the antibodies generated in women by the beta subunit of human chorionic gonadotropin (β hCG) and β hCG associated with alpha subunit of ovine luteinizing hormone linked to carriers. *Am. J. Reprod. Immunol.* **22**, 124-126.
- PRIDEAUX, C.T., KUMAR, S., and BOYLE, D.B. (1990). Comparative analysis of vaccinia virus promoter activity in fowlpox and vaccinia virus recombinants. *Virus Res.* **16**, 43-58.
- RAMAKRISHNAN, S., DAS, C., DUBEY, S.K., SALAHUDDIN, M., and TALWAR, G.P. (1979). Immunogenicity of three C-terminal synthetic peptides of the beta subunit of human chorionic gonadotropin and properties of the antibodies raised against 45-amino acid C-terminal peptide. *J. Reprod. Immunol.* **1**, 249-261.
- REDDY, D.A., BERGMANN, C.C., BERRIMAN, M.J., BOTH, G.W., COUPAR, B.H., BOYLE, D.B., ANDREW, M.E., and BELLAMY, A.R. (1992). Rotavirus VP6 modified for expression of the plasma membrane forms arrays and exhibits enhanced immunogenicity. *Virology* **189**, 423-434.
- REDDY, V.B., BECK, A.K., GARRAMONE, A.J., VELLUCCI, V., LUSTBADER, J., and BERNSTINE, E.G. (1985). Expression of human choriogonadotropin in monkey cells using a single simian virus 40 vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3644-3648.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 1 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) pp. 7.43-7.52.
- SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing by chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- SHUMAN, S., and MOSS, B. (1988). Vaccinia virus poly(A) polymerase: specificity for nucleotides and nucleotide analogs. *J. Biol. Chem.* **263**, 8405-8412.
- SINGH, O., and CAPOOR, A.K. (1993). Radioimmunoassay of gonadotropins. In: *Handbook of Practical and Clinical Immunology*. Vol. 2. G.P. Talwar, ed. (CBS Publishers, New Delhi) pp. 40-54.
- SINGH, O., RAO, L.V., GAUR, A., SHARMA, N.C., ALAM, A., and TALWAR, G.P. (1989). Antibody response and characteristics of antibodies in women immunized with three contraceptive vaccines inducing antibodies against human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* **52**, 739-744.
- SOLOMON, J.J. (1975). Preparation of avian cell cultures. *Tiss. Cult. Assoc.* **1**, 7-11.
- SRINIVASAN, J., SINGH, O., CHAKRABARTI, S., and TALWAR, G.P. (1995). Targeting vaccinia virus-expressed secretory β subunit of human chorionic gonadotropin to the cell surface induces antibodies. *Infect. Immun.* **63**, 4907-4911.
- TALWAR, G.P., SINGH, O., GUPTA, S.K., HASNAIN, S.E., PAL, R., MAJUMDAR, S., VRATI, S., MUKHOPADHYAYA, A., SRINIVASAN, J., DESHMUKH, U., GANGA, S., MANDOKHOT,

- A., and GUPTA, A. (1997). The HSD-hCG vaccine prevents pregnancy in women: feasibility study of a reversible, safe, contraceptive vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.* **37**, 153-160.
- TALWAR, G.P., SINGH, O., PAL, R., CHATTERJEE, N., SAHAI, P., DHALL, K., KAUR, J., DAS, S.K., SURI, S., BUCKSHEE, K., SARAYA, L., and SAXENA, B.N. (1994). A vaccine that prevents pregnancy in women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8532-8536.
- TAYLOR, J., WEINBERG, R., LANGUET, B., DESMETTRE, P., and PAOLETTI, E. (1988). Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* **6**, 497-503.
- TORDO, N., POCH, O., ERMINE, A., KEITH, G., and ROUGEON, F. (1986). Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3914-3918.
- TRIPATHY, D.N., and WITTEK, R. (1990). Regulation of foreign gene in fowlpox virus by a vaccinia virus promoter. *Avian Dis.* **34**, 218-220.
- YELVERTON, E., NORTON, S., OBIJESKI, J.F., and GOEDDEL, D.V. (1983). Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science* **219**, 614-620.
- YUEN, L., and MOSS, B. (1987). Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of vaccinia virus early genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6417-6421.

Address reprint requests to:

Dr. Om Singh
Immunoendocrinology Unit
National Institute of Immunology
New Delhi 110067, India

Received for publication January 6, 1998; accepted March 4, 1998.

Membrane Fusion Activity, Oligomerization, and Assembly of the Rabies Virus Glycoprotein

MICHAEL A. WHITT,^{*1,2} LINDA BUONOCORE,^{*} CHRISTOPHE PREHAUD,[†] AND JOHN K. ROSE^{*}

^{*}Departments of Pathology and Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510; and [†]NERC Institute of Virology, Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, United Kingdom

Received July 12, 1991; accepted August 19, 1991

The spike glycoprotein (G protein) of rabies virus (CVS strain) expressed in HeLa cells from cloned cDNA mediated membrane fusion after exposure to pHs of 6.1 or below. Chemical crosslinking showed that the rabies G protein, like the vesicular stomatitis virus (VSV) G protein, could be crosslinked to dimers and trimers, indicating that rabies G protein is a trimer. However, unlike the VSV G protein, rabies G protein trimers were not stable to sedimentation in sucrose gradients, even at a mildly acidic pH which stabilizes the VSV G protein trimers. In addition, we report that the expressed rabies virus G protein was functional because it could assemble into VSV particles (tsO45) lacking VSV G protein and rescue infectivity. These VSV (rabies) pseudotypes were neutralized only by an antibody to the rabies G protein. We also examined the properties of a hybrid protein containing the extracellular domain of the rabies virus glycoprotein and the transmembrane and cytoplasmic domains of the VSV G protein. This protein was transported to the cell surface and could be crosslinked to form dimers and trimers, but had little or no detectable membrane fusion activity. The lack of fusion activity was paradoxical because the hybrid protein could rescue VSV infectivity, although the titers were lower than those obtained with the wild-type rabies G protein. © 1991 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Rabies virus is a member of the family Rhabdoviridae and it shares many of the structural features characteristic of other members of this virus family including vesicular stomatitis virus (VSV), the prototype rhabdovirus. Both rabies virus and VSV have bullet-shaped virions composed of a tightly coiled ribonucleocapsid surrounded by a lipid envelope containing approximately 1200 molecules of a spike glycoprotein (G protein). The G protein of rabies virus, like that of VSV, is responsible for binding of virions to the cell surface and, after endocytosis, delivery of nucleocapsids into the host cell cytoplasm via fusion of the viral envelope with the endosomal membrane (Superti *et al.*, 1984). In addition, the G proteins are the target of neutralizing antibodies for both VSV and rabies virus (Kelly *et al.*, 1972; Wiktor *et al.*, 1973).

The glycoprotein of rabies virus (CVS strain) consists of a 438 amino acid ectodomain that has three potential sites for N-linked glycosylation, a 22 amino acid transmembrane domain, and a 44 amino acid cytoplasmic domain (Fig. 1). Sequence comparisons of the VSV and rabies G proteins indicate that the two glycoproteins are distantly related, sharing approximately 20% amino acid identity (Rose *et al.*, 1982). This degree of relatedness, as well as conservation of cysteine residues in 8 of 17 positions, suggests that the VSV and rabies G protein ectodomains have similar three-dimensional structures.

Previous studies have shown that the G protein of VSV is a homotrimer (Doms *et al.*, 1987, 1988). In contrast to VSV G protein, relatively little is known about the oligomeric structure of rabies G protein, although there is one report of a large rabies G protein complex obtained from virions (Dietzschold *et al.*, 1978). Here we examined the oligomeric structure of rabies G protein and show that, like VSV G, it is probably a trimer. We also examined the ability of rabies G protein to mediate membrane fusion and found that rabies G protein expressed in HeLa cells induced syncytia formation after activation by treatment with acidic pH.

The similarities between VSV and rabies G proteins led us to determine whether rabies G protein could assemble and function in VSV particles. We have recently described a rescue assay for studying the assembly of wild-type or mutated VSV G proteins expressed from cDNA into particles that lack endogenous G protein (Whitt *et al.*, 1989). From these studies we concluded that at least a portion of the cytoplasmic domain was required for the efficient assembly of G protein into virus particles. Although the cytoplasmic domains of rabies G protein (44 amino acids) and VSV G (29 amino acids) are similar in size and overall charge, they do not share obvious sequence homology. Using the rescue assay, we found that rabies G protein could be incorporated into VSV particles to generate VSV (rabies) pseudotypes, but the titers obtained

¹ To whom reprint requests should be addressed.

² Present address: Department of Microbiology and Immunology, The University of Tennessee, Memphis, Memphis, TN 38163.

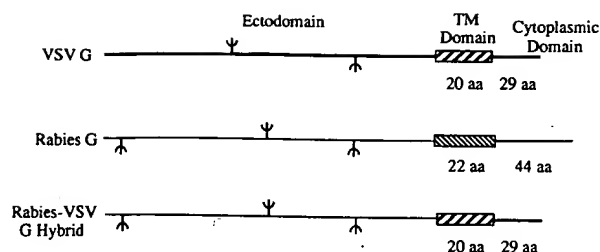


Fig. 1. Schematic representation of VSV G protein, rabies G protein, and a hybrid glycoprotein consisting of the rabies G ectodomain fused precisely with the VSV G transmembrane and cytoplasmic domains. VSV sequences are represented by the heavy line and the transmembrane (TM) domain is shown as (▨). Rabies G protein sequences are represented by the thin line and the transmembrane domain is shown as (▨). Potential sites for N-linked glycosylation are shown (ψ).

were approximately 100-fold lower than those obtained with wild-type VSV G protein. A slower rate of transport of rabies G protein to the cell surface may be at least partially responsible for the reduced infectivity.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructions

The cDNA for the rabies virus glycoprotein (CVS strain) was excised with *Bam*HI from pCP2 (Prehaud *et al.*, 1989) and ligated into the unique *Bam*HI site of pET-3 (Rosenberg *et al.*, 1987), and after transformation into *Escherichia coli* strain C600 the resultant clones were screened for orientation by restriction endonuclease analysis. A plasmid with the correct orientation for expression from the T7 promoter was designated pAR-G_R. To construct a cDNA for the rabies-VSV hybrid G protein diagrammed in Fig. 1, we performed a four-part ligation of a 1365-bp *Bam*HI-*Hinc*II fragment containing most of the coding region of the rabies G ectodomain, a synthetic oligonucleotide linker (coding strand; 5'GACCTGGGTCTCCCGAAGTGGGAAAGAGC 3'; noncoding strand; 5'CCGAGCTCTTCCCCAGTTCGGGAGACCCAGGTC 3'; *Hinc*II_(blunt) → *Ava*I) coding for the remaining portion of the rabies G protein ectodomain, a 300-bp *Ava*I → *Bam*HI fragment from pTZU18-GA coding for the transmembrane and cytoplasmic domains of VSV G protein (Shaw *et al.*, 1989), and the pET-3 vector. The plasmid pAR-G containing the cDNA for VSV G protein in pET-3 has been described previously (Whitt *et al.*, 1989).

Cell culture, viruses, transfections, and rescue assay

Baby hamster kidney (BHK-21), mouse fibroblast (L), and HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% fetal calf serum

(FCS). Stocks of tsO45 and the recombinant vaccinia virus vTF7-3 were prepared as described previously (Whitt *et al.*, 1989). Cell transfections were mediated using a suspension of liposomes composed of L- α -dioleoylphosphatidylethanolamine and the cationic lipid dimethyldioctadecyl ammonium bromide (Rose *et al.*, 1991; Whitt *et al.*, 1991). Rescue of tsO45 was performed as described previously (Whitt *et al.*, 1989).

Metabolic labeling, sucrose gradient centrifugation, and chemical crosslinking

BHK-21 cells (5×10^5 cells in 35-mm dishes) were infected with vTF7-3 at an m.o.i. of 10 and transfected with 5 μ g of the appropriate plasmid. Cells transiently expressing rabies or VSV G proteins were radioactively labeled with [35 S]methionine for 30 min in serum-free, methionine-free DMEM at 4 hr post-transfection using Tran[35 S]label (ICN Biochemicals, Inc.) and chased for 2 hr with DMEM containing 5% FCS and 2 mM excess unlabeled methionine. Analysis of G protein oligomers was performed as described previously (Crise *et al.*, 1989; Doms *et al.*, 1987) with the following modifications. Cell extracts were prepared by detergent lysis for 2 min at room temperature using 1% Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) in 2X MNT buffer, pH 5.8 (40 mM 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, 60 mM Tris, 200 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 2 mM EGTA). Nuclei and cell debris were removed by centrifugation at 14,000 rpm for 2 min in a microcentrifuge (Eppendorf) and the detergent extracts were loaded onto linear sucrose gradients prepared from stocks of 5 and 20% (w/w) sucrose in 1X MNT (pH 5.8) containing 0.1% Triton X-100. The gradients were centrifuged at 45,000 rpm for 16 hr using a SW 50.1 rotor at 4° (Beckman Instruments, Inc.). Fractions were collected from the bottom, made to 1% NP-40, 0.3% deoxycholate, 0.1% SDS, 25 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.4), immunoprecipitated with either VSV-specific polyclonal antiserum or a monoclonal antibody (27 EB1 from the Collection of Laboratoire de Génétique des Virus, CNRS, France) specific for rabies G protein (Prehaud *et al.*, 1988), and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

For crosslinking analysis, cells were radioactively labeled as described above, removed from the culture dish with PBS containing 50 mM EDTA, and resuspended in 450 μ l PBS (pH 8.5). The cell suspension was divided into 100- μ l aliquots and 1 μ l of a stock solution of the cleavable crosslinker dithiobis-succinimidyl propionate (DSP) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added. The concentrations of the stock solution of DSP were varied to give the final concentrations indicated in the figure legend. The aliquots were

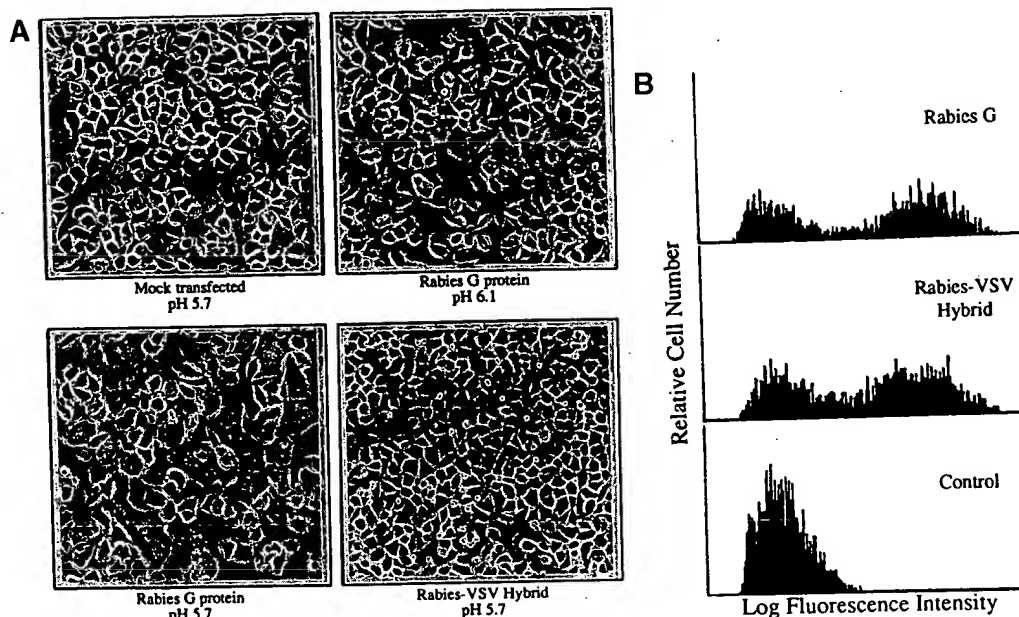


Fig. 2. (A) Low pH-induced syncytia formation in cells expressing rabies G protein. HeLa cells were infected with vTF7-3 and transfected with plasmids encoding wild-type rabies G protein or the rabies-VSV hybrid G protein, or were mock transfected. The cells were incubated for 7 hr to allow accumulation of G protein on the cell surface and then treated with fusion media buffered to pH 6.1 or 5.7 at ambient temperature for 1 min as described previously (Whitt *et al.*, 1990). The cultures were examined for syncytia after 1 hr and photographed. (B) Flow cytometry of cells expressing rabies G proteins. Parallel cultures that were not treated with fusion media were processed for flow cytometry at 7 hr posttransfection as described previously (Whitt *et al.*, 1990) using ascites fluid containing the anti-rabies G protein monoclonal antibody 27 EB1 (diluted 1:100) as the primary antibody. Profiles of cells expressing rabies G, the rabies-VSV hybrid, and a mock-transfected control are shown.

made to 0.2% Nonidet P-40 (NP-40) and then incubated for 30 min at 4°. The reaction was quenched with 50 mM glycine by incubating for 5 min on ice. The cells were then lysed with detergent solution (1% NP-40, 0.3% deoxycholate, 25 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.4) containing 100 kallikrein units of aprotinin (Sigma Chemical Co.) for 2 min at room temperature. The nuclei were removed by centrifugation at 14,000 *g* for 2 min in a microcentrifuge (Eppendorf), the supernatant was made to 0.1% SDS, and the G proteins were immunoprecipitated and analyzed by SDS-PAGE.

RESULTS

Fusion activity of rabies G protein

To determine whether rabies G protein expressed alone had membrane fusion activity, we treated HeLa cells that were transiently expressing wild-type rabies G protein with media buffered at different pHs in the range 6.5 to 5.2 for 1 min and then examined the cultures for syncytia after 1 hr. Figure 2A shows examples of syncytia formation after exposure to pHs 6.1 and 5.7. No fusion occurred when cells expressing rabies G protein were incubated at pH values above 6.1. In parallel cultures, VSV G protein had fusion activity at

pH 6.3 or below (data not shown), indicating a slightly higher pH threshold for its fusion activity.

For the purpose of studying the incorporation of rabies G protein into VSV virions, we constructed a hybrid gene encoding the extracellular domain of rabies G linked to the transmembrane and cytoplasmic domains of VSV G protein (Fig. 1). This hybrid protein appeared not to have fusion activity even at pHs as low as 5.2. Lower pHs were not examined because we found that cells infected with vTF7-3 alone formed a small number of syncytia at 7.5 hr postinfection (p.i.) after treatment with fusion medium at pH 5.0 and below. It had been reported previously that vaccinia virus expresses a fusion protein beginning 6 to 7 hr p.i. (Rodriguez *et al.*, 1987) and by 12 hr p.i. extensive polykaryon formation occurs after activation at pH 5.5 (Doms *et al.*, 1990). The amount of rabies G protein on the cell surface was comparable for both the wild-type and the hybrid proteins, indicating that lack of fusion activity was not due to a lower level of surface expression of the hybrid protein (Fig. 2B).

Oligomeric structure of rabies G protein

Previous studies using sucrose gradient sedimentation and chemical crosslinking have shown that the



Fig. 2. Mobility-shift assay using end-labeled ACF-12 ds oligonucleotide probe (1 ng) and 5 μ g crude CEF nuclear extract protein (Lane 2). Complexes were allowed to form at 37° for 30 min and resolved by electrophoresis through 4% nondenaturing polyacrylamide gels as described under Materials and Methods. Control reaction (Lane 1) contained labeled probe DNA and buffer D (Dignam *et al.*, 1983), but no nuclear extract protein. The position of unbound probe is indicated by a bracket while that of the protein-DNA complex (ACF) is indicated by an arrow, left of lane 1.

gp57-65 promoter may contain *cis*-acting elements important for efficient transcription of gp57-65 promoter-gene templates. To identify potential sites of protein-DNA interactions within this region, mobility-shift and DNase I footprinting assays were performed. Using a radiolabeled 78-bp *Bam*HI to *Hha*I fragment (nucleotides -241 to -165) and crude DEF or CEF nuclear extracts, multiple sites of sequence-specific protein-DNA interactions were observed (data not shown).

To more precisely map the locations of specific protein-DNA interactions within this region, restriction endonuclease subfragments and synthetic ds oligonucleotides representing sequences contained within the 78-bp *Bam*HI to *Hha*I region were used as probes in mobility-shift and DNase I footprinting assays. One region of approximately 17 bp (nucleotides -193 to -177) consistently formed a distinct protein-DNA complex when ds oligonucleotides representing this region were used as probes in mobility-shift assays (Fig. 2). These sequences (5'-CTAGTTTACTTGTGTG-3') correspond to a region identified by *in vitro* transcription assays as important for gp57-65 gene transcription. Interactions between nuclear extract proteins and the 17-bp ds oligonucleotide were selected for further study.

Sequence specificity of DEF nuclear extract factors binding to ACF recognition sequences

To test the specificity of nuclear extract proteins (tentatively termed ACF) binding to the 17-bp ds oligonucleotide probe (ACF-12), two nonspecific competitor ds oligonucleotides were constructed. One 20-bp oligonucleotide, C1011, contained a base composition similar to that of the ACF binding site in randomized sequence order (5'-TCTTTGATTGTTTATGTCAA-3'). Another ds oligonucleotide (C1 oligomer, Fujita *et al.*, 1987) corresponds to a repeat of the interferon response element binding site (IRE, Fujita *et al.*, 1987) and was unrelated to ACF-12 sequence or base composition. Competition mobility-shift experiments were conducted by mixing 1 ng (approximately 10,000 CPM) of radiolabeled ACF-12 oligonucleotide with various amounts of unlabeled competitor DNA. Binding reactions were initiated by addition of competitor-probe mixtures to nuclear extracts from uninfected DEF cells and incubation at 37°. All reactions contained a 1000-fold molar excess (relative to labeled probe DNA) of poly(dI-dC). Protein-DNA complexes were resolved by nondenaturing PAGE and detected by autoradiography of dried gels as described under Materials and Methods. As expected, unlabeled ACF-12 DNA (specific competitor) competed effectively for binding of DEF nuclear extract proteins to labeled ACF-12 probe (Fig. 3, lanes 3 to 5). Unlabeled C1011 DNA (nonspecific competitor) competed much less effectively for binding of DEF nuclear extract proteins to labeled ACF-12 probe DNA (Fig. 3, lanes 7 to 9). The C1 oligomer was significantly less effective in competing for binding of DEF nuclear extract proteins to labeled ACF-12 probe DNA than either unlabeled ACF-12 or C1011 DNA (Data not shown).

Functional analysis of ACF recognition sequences

Results of competition mobility-shift assays indicated that ACF bound to the 17-bp ACF-12 ds oligonucleotide in a sequence-specific manner. These data, combined with the results of *in vitro* transcription assays using gp57-65 promoter-deletion mutant templates, suggested that ACF may function to positively regulate gp57-65 gene transcription by direct interaction with the gp57-65 gene promoter. The potential functional significance of ACF interactions with gp57-65 promoters was investigated by two independent methods: (1) CAT enzyme activity associated with gp57-65 promoter-deletion constructs, and (2) Direct competition for ACF binding in MDV infected cells.

*Hind*III to *Hinf*I fragments (containing gp57-65 upstream sequences) from promoter-deletion mutants were inserted upstream of a CAT structural gene in

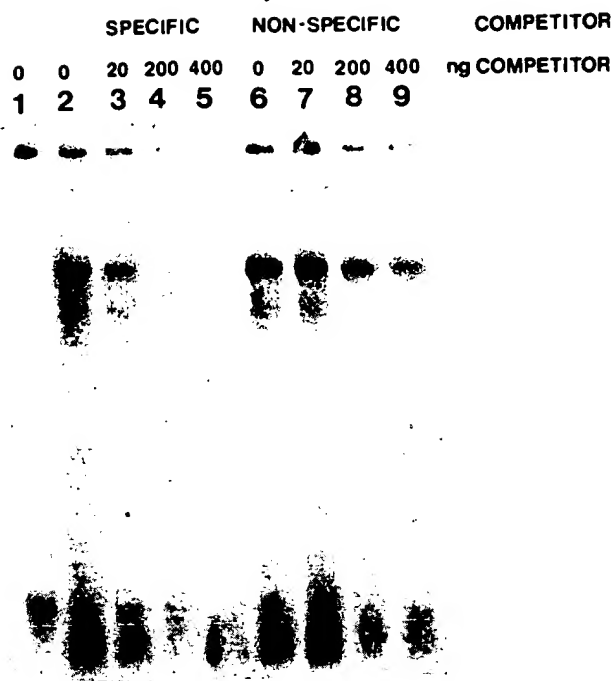


Fig. 3. Competition mobility-shift assay using end-labeled ACF-12 ds oligonucleotide probe (1 ng/lane). Probe DNA was incubated with (lanes 2 to 9) or without (lane 1) 5 μ g of DEF nuclear extract protein. Complexes were allowed to form at 37° for 15 min in the presence (Lanes 3, 4, 5, 7, 8, and 9) or absence (Lanes 1, 2, and 6) of unlabeled specific (ACF-12) (lanes 3 to 5) or nonspecific (C1011) (lanes 7 to 9) competitor ds oligonucleotides. Unbound probe DNA was run off the gel in this experiment.

plasmid pCATbasic, a promoterless CAT expression plasmid. In each of these plasmids, the CAT gene start site lies 178 bp downstream of the gp57-65 mRNA initiation site. Transient expression of CAT enzyme activity in CEF cells transfected with gp57-65 promoter mutant-CAT constructs was taken as a measure of transcriptional efficiency (Gorman *et al.*, 1982).

CEF cells transfected with plasmid p20G-cat efficiently expressed CAT enzyme activity, measured 48 hr post-transfection (Fig. 4). CAT activity in cells containing mutant p49C-cat plasmids was twofold lower than that in cells containing p20G-cat plasmids (Fig. 4). Deletion of additional sequences, including the ACF binding site, to nucleotide -165 (mutant p79C-cat) further reduced intracellular expression of CAT activity by over twofold relative to that observed in cells containing p49C-cat (Fig. 4). These results were consistent with results of *in vitro* transcription analyses using similar promoter-deletion templates (Fig. 1A). In contrast to *in vitro* transcription assay results, however, deletion of additional nucleotides to within 60 bp (plasmid p171T-cat) of the gp57-65 mRNA cap site increased expression of CAT enzyme levels sixfold relative to that

observed in cells transfected with p79C-cat and almost twofold over that in cells containing p20G-cat (Fig. 4).

To more accurately determine the direct effect of ACF on transcriptional activity of intact gp57-65 promoters, oligonucleotide transfection inhibition assays were initiated. Transfection of MDV strain GA infected cells with increasing amounts of ds ACF-12 oligonucleotide reduced levels of gp57-65-specific RNA by over twofold relative to those of mock-transfected cells (Fig. 5). In contrast, transfection of similar cells with as much as 20 μ g of ds C1011 oligonucleotide (nonspecific competitor) did not adversely affect expression of gp57-65 RNA (Fig. 5). Expression of β -actin RNA was unaffected by either treatment. Results similar to those depicted in Fig. 5 were observed in four independent experiments.

DISCUSSION

As molecular biological characterization of Marek's disease virus progresses, factors affecting expression of MDV genes will need to be investigated. Regulation of MDV gp57-65 is of particular interest since attenuation of oncogenic MDV often correlates with loss of gp57-65 expression (Churchill *et al.*, 1969; Ross, 1982; Schat *et al.*, 1985). However, nononcogenic strains of MDV (i.e., serotype II) express proteins immunologically related to gp57-65 (Schat and Calnek, 1978) and oncogenic viruses have been isolated which

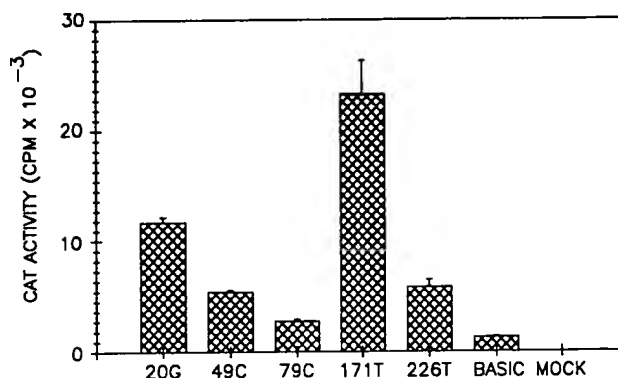


FIG. 4. Assay of CAT enzyme activity in CEF cells transfected with 10 μ g of gp57-65 promoter-deletion CAT gene constructs. Plasmids and CAT assay details are described under Materials and Methods. Activity is presented as CPM of [14 C]acetyl chloramphenicol produced, corrected for background levels associated with mock-transfected controls. Each data point represents the mean of at least four replicate samples. CAT activity in extracts of cells containing a "full-length" gp57-65 gene promoter-CAT clone was greater than that measured for cells containing mutant 20G. Errors associated with full-length promoter assays were, however, considerably larger than those associated with any mutant promoter assays (data not shown).

TABLE 2
RESCUE WITH G PROTEINS AND NEUTRALIZATION
WITH RABIES-SPECIFIC ANTIBODY

Expressed protein	Titer* (PFU/ml)		Neutralization ^b	
	L-cells	BHK-21	anti-VSV	anti-Rabies
VSV G	1.3×10^5	4.3×10^5	2×10^1	3.4×10^5
Rabies G	4.6×10^2	8.1×10^3	8.7×10^3	1.7×10^2
Rabies-VSV	2×10^2	2.4×10^3	1.7×10^3	1.9×10^2
None (VTF7-3)	2×10^1	8×10^1	$<10^1$	1.6×10^2

* Titers are the average of at least three separate experiments.

^b Supernatants containing virus were incubated for 1 hr at 25° with polyclonal anti-VSV antiserum (1:1000) or ascites fluid (1:100) containing a monoclonal (27 EB1) recognizing antigenic site III on rabies G protein (CVS strain). Titers (PFU/ml) were determined after plaqueing on BHK-21 cells.

particles rescued with wild-type rabies G protein were titered on mouse L-cells, a 25-fold increase in infectivity was observed over the VTF7-3-infected, nontransfected control; however, a 100-fold increase was observed when the same particles were titered on BHK cells. These results indicated that the infectivity of these particles was somewhat cell dependent. For comparison, particles rescued with VSV G protein gave similar titers when assayed on the two cell lines. Neutralization using either VSV-specific or rabies-specific antibodies confirmed that the infectivity was due to the expressed protein. Surprisingly, complementation with the rabies-VSV hybrid G protein that apparently lacks fusion activity resulted in the production of a low level of infectious virus. The particles produced were neutralized by antibody specific for rabies, indicating that they were VSV (rabies) pseudotypes.

Transport kinetics of rabies and hybrid rabies-VSV G proteins

The amount of infectious virus that is produced from an infected cell can be influenced by the amount of envelope protein delivered to the cell surface for incorporation into virions. Because the rate at which G protein is transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex influences the rate of accumulation on the plasma membrane, we examined the acquisition of endoglycosidase H (endo H)-resistant sugars for wild-type rabies and the rabies-VSV hybrid G proteins. Endo H resistance indicates the arrival of glycoproteins in the medial cisternae of the Golgi (Dunphy and Rothman, 1985). Cells expressing either wild-type or hybrid rabies G proteins were pulse-labeled for 10 min and then chased for various times. The proteins were immunoprecipitated and then incubated in the presence

(+) or absence (−) of endo H followed by SDS-PAGE. Figure 5 shows that both wild-type and hybrid rabies G proteins had half-times of approximately 50 min for acquisition of endo H-resistant sugars. For comparison, VSV G acquires endo H-resistant sugars with a half-time of 15 to 20 min (Rose and Bergmann, 1983). These results indicated that rabies G protein would accumulate on the cell surface less rapidly than VSV G protein and the resulting lower levels of surface expression might partially explain the 50-fold difference in the amount of infectious virus recovered after rescue with rabies G compared to VSV G protein. Similar reductions in titer were found previously for mutated VSV G proteins that are transported more slowly, and accumulate to lower levels on the cell surface, than wild-type G protein (Whitt *et al.*, 1989).

DISCUSSION

In this study we transiently expressed the G protein from the CVS strain of rabies virus in HeLa cells and found that it had membrane fusion activity causing syncytia formation after exposure of cells to pHs of 6.1 or below. During rabies virus infection, the rabies G protein presumably mediates fusion of the viral envelope

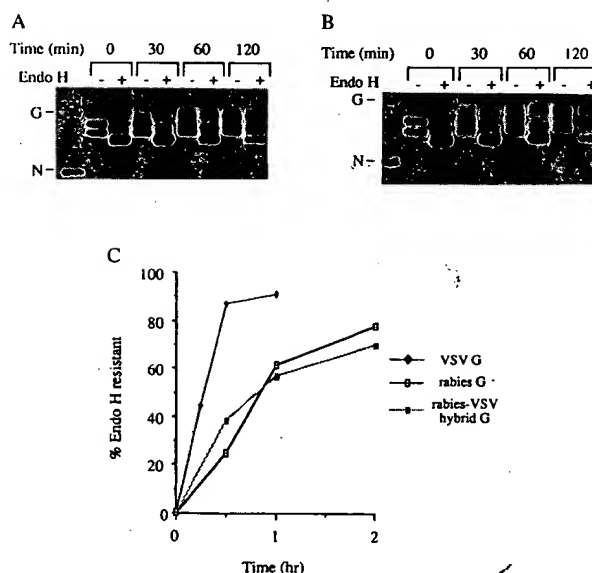


FIG. 5. Kinetics of wild-type and hybrid rabies G protein transport. Cells expressing either wild-type (A) or hybrid (B) rabies G proteins were pulse-labeled for 10 min and then chased for the times indicated. The proteins were immunoprecipitated as described in Fig. 4 and then incubated in the presence (+) or absence (−) of Endo H followed by SDS-PAGE. The positions of the VSV G and nucleocapsid (N) proteins are shown. (C) Graphic representation of the percentage of endo H-resistant oligosaccharides determined by scanning densitometry of the fluorograms.

lope with the endosomal membrane after endocytosis and acidification of the endosome (Superti *et al.*, 1984). Earlier studies have shown that rabies virus particles have membrane fusion activity and will cause fusion of human erythrocytes at pHs below 6.2 (Mifune *et al.*, 1982). Our studies provide definitive evidence that rabies G protein is the only viral protein required for fusion activity. We also found that a hybrid protein having the extracellular domain of rabies G protein linked to the transmembrane and cytoplasmic domains of the VSV G protein did not have detectable fusion activity when assayed by syncytia formation, even at pHs as low as 5.2. The hybrid protein was expressed on the cell surface as well as wild-type rabies G protein and it appeared to oligomerize correctly. It seems likely that the hybrid protein has some minor alteration in folding that interferes with fusion activity or with its ability to undergo a conformational change required for fusion.

The original evidence for an oligomeric structure of VSV G protein was from sedimentation of detergent-solubilized protein on sucrose gradients. Definitive evidence that the oligomer was a trimer was from chemical crosslinking showing dimers and trimers (Doms *et al.*, 1987, 1988; Kreis and Lodish, 1986). Using chemical crosslinking, we found that the rabies G protein, like the VSV G protein, could be crosslinked to dimers and trimers, indicating that it is also a homotrimer.

The studies employing sedimentation in sucrose gradients to examine VSV G protein oligomerization revealed that VSV G trimers are unstable at neutral pH and sediment as monomers (sedimentation coefficient = 4 S). However, the trimeric structure is stabilized to sedimentation on sucrose gradients at pHs below 6.0 (Doms *et al.*, 1987). Using conditions under which VSV G protein is stabilized and sediments as a trimer (8 S), we show that rabies G protein had a sedimentation coefficient of 4 S, suggesting that it is monomeric. Our inability to detect the rabies G protein trimer on sucrose gradients probably reflects weaker interactions between the ectodomain subunits. Recent studies have shown that VSV G protein trimers are inherently unstable and in a dynamic equilibrium with monomers both *in vitro* (Lyles *et al.*, 1990) and *in vivo* (Zagouras *et al.*, 1991). We suggest that a similar situation holds for rabies G, but that the subunit-subunit interactions are not significantly stabilized at low pH.

Studies on the structure of rabies G protein have shown that there are two forms in virions that result from glycosylation at either one or two of the three potential sites (Wunner *et al.*, 1985). The addition of N-linked sugars appears to be important for many glycoproteins in attaining the correct final conformation, possibly by providing constraints on folding intermediates during the initial phases of folding after translo-

cation into the endoplasmic reticulum. One model for the structure of rabies G protein proposes that oligomers contain both glycosylated forms of rabies G protein (Dietzschold *et al.*, 1978). Assembly of rabies G protein monomers that are differentially glycosylated may result in oligomers that are more easily dissociated after detergent extraction and sedimentation in sucrose gradients. Because the G proteins of some rabies virus strains do not have this differential glycosylation, it should be possible to test this model.

Our previous studies showed that there is sufficient structural information for VSV G protein oligomerization in the ectodomain alone because both soluble and lipid-anchored forms of VSV G protein form trimers (Crise *et al.*, 1989). It is therefore not surprising that the hybrid protein with the extracellular domain of rabies G linked to the transmembrane and cytoplasmic domains of VSV G formed trimers as assayed by chemical crosslinking, although these trimers were also unstable to sedimentation on sucrose gradients.

Using an assay that depends on the rescue of a temperature-sensitive mutant of VSV (tsO45), we were able to show that the G protein of rabies virus can assemble into VSV virions to produce infectious particles. The infectivity was due to the rabies G protein because it was specifically neutralized by an anti-rabies monoclonal antibody; however, the titers obtained after rescue of tsO45 with rabies G protein were 50- to 100-fold lower than those obtained after rescue with wild-type VSV G protein. The reduced titers might reflect lower levels of expression on the cell surface, less efficient incorporation of rabies G protein into VSV particles, or a reduced ability to mediate infection. Because we have not been able to measure the absolute level of rabies G incorporation into VSV particles, we cannot comment specifically on the efficiency of incorporation of the foreign protein. In addition, because the rescue assay only measures the ability of expressed glycoproteins to assemble and function in virions, we are not able to determine if rabies G can completely replace VSV G protein in the formation of virions. This will require the development of a system in which the genome of VSV can be manipulated to allow the exchange of VSV genes for those of other viral proteins. Surprisingly, the rabies VSV G hybrid protein, which appeared to lack fusion activity, was able to rescue the tsO45 mutant, although it gave titers 2- to 5-fold below those of the wild-type rabies protein. If this hybrid protein truly lacks fusion activity, it is difficult to explain how infectious virus is produced. It seems most likely that it has a latent fusion activity that is increased once it is concentrated in virus particles or that it has a low level activity that is sufficient to mediate viral entry.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Roberto Cattaneo and Rebecca Burdine for helpful comments on the manuscript. This work was supported by Grant AI-4345 from the NIH and by a NIH postdoctoral fellowship (GM 2168) to M.A.W.

REFERENCES

- RISE, B., RUUSALA, A., ZAGOURAS, P., SHAW, A., and ROSE, J. K. (1989). Oligomerization of glycolipid-anchored and soluble forms of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J. Virol.* **63**, 5328-5333.
- DIETZSCHOLD, B., COX, J. H., SCHNEIDER, L. G., WIKTOR, T. J., and KOPROWSKI, H. (1978). Isolation and purification of a polymeric form of the glycoprotein of rabies virus. *J. Gen. Virol.* **40**, 131-139.
- DOMS, R. W., BLUMENTHAL, R., and MOSS, B. (1990). Fusion of intra- and extracellular forms of vaccinia virus with the cell membrane. *J. Virol.* **64**, 4884-4892.
- DOMS, R. W., KELLER, D. S., HELENIUS, A., and BALCH, W. E. (1987). Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *J. Cell Biol.* **105**, 1957-1969.
- DOMS, R. W., RUUSALA, A., MACHAMER, C., HELENIUS, J., HELENIUS, A., and ROSE, J. K. (1988). Differential effects of mutations in three domains on folding, quaternary structure, and intracellular transport of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Cell Biol.* **107**, 89-99.
- UNPHY, W. G., and ROTHMAN, J. E. (1985). Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* **42**, 13-21.
- LAMAND, A. (1970). Etude des genetiques du virus de la stomatite vesiculaire: Classement de mutants thermosensibles spontanés en groupes de complementation. *J. Gen. Virol.* **8**, 187-195.
- ELLY, J. R., EMERSON, S. U., and WAGNER, R. R. (1972). The glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibodies. *J. Virol.* **10**, 1231-1235.
- REIS, T. E., and LODISH, H. F. (1986). Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein to the cell surface. *Cell* **46**, 929-937.
- HEMMEL, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.
- RYLES, D. S., VARELA, V. A., and PARCE, J. W. (1990). Dynamic nature of the quaternary structure of the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* **29**, 2442-2449.
- MACHAMER, C. E., DOMS, R. W., BOLE, D. G., HELENIUS, A., and ROSE, J. K. (1990). Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 6879-6883.
- MIFUNE, K., OHUCHI, M., and MANNEN, K. (1982). Hemolysis and cell fusion by rhabdoviruses. *FEBS Lett.* **137**, 293-297.
- PREHAUD, C., COULON, P., LAFAY, F., THIERS, C., and FLAMAND, A. (1988). Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: Structure and role in viral virulence. *J. Virol.* **62**, 1-7.
- PREHAUD, C., TAKEHARA, K., FLAMAND, A., and BISHOP, D. H. L. (1989). Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Virology* **173**, 390-399.
- RODRIGUEZ, J. F., PAEZ, E., and ESTABAN, M. (1987). A 14,000-Mr envelope protein of vaccinia virus is involved in cell fusion and forms covalently linked trimers. *J. Virol.* **61**, 395-404.
- ROSE, J. K., and BERGMANN, J. E. (1983). Altered cytoplasmic domains affect intracellular transport of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Cell* **34**, 513-524.
- ROSE, J. K., BUONOCORE, L., and WHITT, M. A. (1991). A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Bio Techniques* **10**, 520-525.
- ROSE, J. K., DOOLITTLE, R. F., ANILIONIS, A., CURTIS, P. J., and WUNNER, W. H. (1982). Homology between the glycoproteins of vesicular stomatitis virus and rabies virus. *J. Virol.* **43**, 361-364.
- ROSENBERG, A. H., LADE, B. N., CHUI, D.-C., LIN, S.-W., DUNN, J. J., and STUDIER, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**, 125-135.
- SHAW, A. S., AMREIN, K. E., HAMMOND, C., STERN, D. F., SEFTON, B. M., and ROSE, J. K. (1989). The *lck* tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* **59**, 627-636.
- SUPERTI, F., DERER, M., and TSIANG, H. (1984). Mechanism of rabies virus entry into CER cells. *J. Gen. Virol.* **65**, 781-789.
- WHITT, M. A., BUONOCORE, L., ROSE, J. K., CICCARONE, V., CHYTIL, A., and GEBEYEHU, G. (1991). TransfectACE Reagent: Transient transfection frequencies greater than 90%. *Focus* **13**, 8-12.
- WHITT, M. A., CHONG, L., and ROSE, J. K. (1989). Glycoprotein cytoplasmic domain sequences required for rescue of a vesicular stomatitis virus glycoprotein mutant. *J. Virol.* **63**, 3569-3578.
- WHITT, M. A., ZAGOURAS, P., CRISE, B., and ROSE, J. K. (1990). A fusion-defective mutant of vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J. Virol.* **64**, 4907-4921.
- WIKTOR, T. J., BYORGY, E., SCHLUMBERGER, H. D., SOKOL, F., and KOPROWSKI, H. (1973). Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol.* **110**, 269-276.
- WUNNER, W. H., DIETZSCHOLD, B., SMITH, C. L., LAFON, M., and COLUB, E. (1985). Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. *Virology* **140**, 1-12.
- ZAGOURAS, P., RUUSALA, A., and ROSE, J. K. (1991). Dissociation and reassociation of oligomeric viral glycoprotein subunits in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **65**, 1976-1984.

Proc

Th
stra
hur
Stra
and
mol
mer
of e
for
mer
gral
not
con
nuc
A
in ir
199
per
NS
ase
kno
bly
pel
(Fe
19
a r

SPECIAL ARTICLE

Non-replicating expression vectors: applications in vaccine development and gene therapy

K. J. LIMBACH AND E. PAOLETTI*

Virogenetics Corporation, Rensselaer Technology Park, 465 Jordan Road, Troy, New York, U.S.A. 12180

SUMMARY

This review presents experimental, preclinical and clinical data illustrating the multiple uses of recombinant non-replicating virus vectors in the fields of immunoprophylaxis and gene therapy.

INTRODUCTION

A variety of non-replicating virus vectors have been developed for vaccine and gene therapy applications. This review will focus on the development of three virus vectors, poxviruses, adenoviruses and retroviruses, and will discuss some of the recent advances made with these vectors in the fields of vaccine immunoprophylaxis and gene therapy.

POXVIRUSES

On 26 October 1979, the World Health Organization announced that smallpox had been eradicated. This monumental achievement was made possible by the immunization of much of the world's population with vaccinia virus, a virus antigenically similar to variola virus, the epizootic agent of smallpox. The success of this vaccine prompted the development of poxviruses as recombinant expression vectors [1, 2]. Poxviruses are very large, double-stranded DNA viruses. Individual species can either have a very broad or very restricted host range. For example, vaccinia virus can replicate in a number of vertebrate species, whilst variola virus only replicates in man; a characteristic that facilitated the eradication of smallpox.

The nucleotide sequence of the Copenhagen strain of vaccinia virus has been determined [3]. The genome is approximately 191 kb and encodes 198 major open reading frames (ORFs). Large regions (> 47 kb) of the genome are non-essential for replication *in vitro*

[4]. In addition, large amounts of heterologous DNA (> 25 kb) can be cloned into a single recombinant [5]. The lack of stringent packaging constraints allows multiple foreign genes to be cloned into the poxvirus genome.

Poxviruses, unlike other DNA viruses, replicate in the cytoplasm of the infected cell. Consequently, enzymatic functions involved in transcription and replication must be supplied by the virus. This has several consequences regarding the use of these viruses as expression vectors. For example, eucaryotic promoters are not efficiently recognized by the poxvirus transcriptional machinery. Therefore, poxvirus promoters must be used for efficient transcription of recombinant genes. In addition, poxvirus transcripts are not spliced. Therefore, genetic material cloned into poxviruses must be in a cDNA rather than a genomic form. Finally, due to the large size and non-infectious nature of poxvirus DNA, foreign genes are cloned into poxviruses by *in vivo* recombination [1].

Vaccines

Numerous examples have been reported in which immunization with a vaccinia virus recombinant expressing an immunogenic antigen of a particular pathogen has protected target species against a subsequent challenge with the corresponding pathogen. For example, oral administration of a vaccinia virus recombinant expressing the rabies glycoprotein has protected foxes and raccoons against rabies [6, 7]. In addition, distribution of a vaccinia virus-rabies glycoprotein recombinant, RABORAL, has dramati-

* To whom correspondence should be addressed.

cally decreased the incidence of rabid foxes and raccoons in European and North American field trials [8, 9]. Vaccinia virus recombinants have also protected target species against vesicular stomatitis, canine distemper, rinderpest, pseudorabies and Venezuelan equine encephalitis [10–14]. Therefore, vaccinia virus recombinants are effective against a variety of infectious diseases.

Smallpox vaccination was responsible for a small number of vaccine-related complications. Not surprisingly, some complications (e.g., encephalitis and progressive vaccinia infection) were associated with the age and immunological status of the vaccinee. Different incidences of complications were also associated with different strains of vaccinia virus. For example, in the Netherlands, complications appeared in approximately 1/4000 primary vaccinees, whilst in the US, where a different strain was used, complications arose in approximately 1/250 000 vaccinees [15].

In response to these safety concerns, highly attenuated vaccinia virus strains have been generated. There is evidence, however, that the genetic background of a vaccinia vector can affect the potency of a subsequent recombinant. For example, a vaccinia virus (WR strain) recombinant expressing the Epstein-Barr virus (EBV) gp340 envelope glycoprotein protected cottontop tamarins against an EBV challenge, whereas another vaccinia virus (Wyeth vaccine strain) recombinant expressing the same antigen was unable to protect tamarins against an identical challenge [16]. Therefore, there is a need for safe, but yet efficacious poxvirus vectors.

NYVAC

NYVAC is a highly attenuated poxvirus vector. It was derived from the Copenhagen strain of vaccinia virus by the precise deletion of 18 ORFs [17]. Many of these ORFs encode functions implicated in the pathogenicity and host range/replication of vaccinia virus. Consequently, NYVAC does not produce detectable ulceration or induration at the site of inoculation, has negligible pathogenicity in newborn and immunocompromized mice and, while retaining the ability to replicate efficiently in primary chick embryo fibroblasts, has a dramatically reduced replicative capacity in murine, porcine, equine and human tissue culture cells.

Despite these highly attenuated properties, NYVAC remains an efficacious vaccine vector. In a

Table 1. *Comparative efficacy of VV-RG, ALVAC-RG and NYVAC-RG in mice*

Recombinant	PD ₅₀ *
VV-RG	3.74
ALVAC-RG	3.86
NYVAC-RG	3.70

* Four to 6-week-old mice were inoculated with 2.0–8.0 log₁₀ tissue culture infection dose 50% (TCID₅₀) of VV-RG, ALVAC-RG or NYVAC-RG. At day 14, the mice were challenged intracranially with 15 lethal dose 50% (LD₅₀) of rabies virus. At day 28, the surviving mice were counted and a PD₅₀ was calculated. (Modified from ref. 17).

rabies challenge study [17], a NYVAC-rabies glycoprotein recombinant (NYVAC-RG) had a virtually identical 50% protective dose (PD₅₀) value as a replication-competent thymidine kinase deficient vaccinia virus-rabies glycoprotein recombinant (VV-RG) (Table 1).

NYVAC recombinants have also protected target species against infectious challenges. A NYVAC recombinant expressing the preM and envelope proteins of Japanese encephalitis virus (JEV) protected pigs against JEV [18], a recombinant expressing the type A1 and type A2 haemagglutinin (HA) glycoproteins of equine influenza virus (EIV) protected horses against EIV [19] and recombinants expressing the gB or gD glycoproteins of pseudorabies virus (PRV) protected pigs against PRV [20]. These studies indicate that NYVAC retains the immunogenicity and potency of a replication-competent vaccinia virus vector, and therefore represents a safer alternative to existing vaccinia strains.

Avipoxviruses

Other poxviruses are also being developed as vaccine vectors. For example, immunization with a raccoonpox recombinant expressing the rabies glycoprotein protected raccoons against rabies [21]. In addition, fowlpox recombinants expressing the influenza virus HA and nucleocapsid proteins, the Marek's disease virus (MDV) gB glycoprotein or the Newcastle disease virus (NDV) fusion or HA glycoproteins protected chickens against influenza, MDV and NDV, respectively [22–25]. In the above examples, the raccoonpox and fowlpox vectors were used in the natural host for these viruses. The fowlpox vector, however, has also been used in animals which are not its natural host. For example, a fowlpox recombinant

expressing the rabies glycoprotein has protected mice, cats and dogs against rabies [26].

Fowlpox virus is the prototypic member of the genus *Avipoxvirus*. An attenuated strain of fowlpox has been used as a vaccine since the 1920s to control fowlpox in poultry. During this time, there have been no reports of transmission to non-avian species. Avipoxviruses do not replicate in non-avian species and can therefore be regarded as naturally attenuated for them. Although infectious particles are not produced, some viral proteins and foreign proteins under the control of appropriate promoters can be expressed in non-avian cells. These vectors are, therefore, attractive vaccine vectors in mammalian, as well as avian, species.

ALVAC. The fowlpox-rabies glycoprotein recombinant was not as potent as a replication-competent vaccinia-rabies glycoprotein recombinant (VV-RG). However, a replication-restricted canarypox-rabies glycoprotein recombinant (ALVAC-RG) was as efficacious as VV-RG. In fact, in a rabies challenge study [17], ALVAC-RG had a virtually identical PD_{50} value to VV-RG (Table 1). The reasons for the difference in potency of the two avipoxvirus recombinants are not immediately obvious.

A plaque-cloned isolate of an attenuated canarypox vaccine strain has been designated ALVAC [17]. As expected, ALVAC has a highly attenuated phenotype, and similar to NYVAC, exhibits negligible pathogenicity in newborn and immunocompromized mice [17].

Although canarypox virus does not replicate in mammalian species, an ALVAC recombinant can be as potent in mammalian target species as a comparable replication-competent vaccinia virus recombinant. For example, dogs immunized with an ALVAC recombinant expressing the measles virus HA glycoprotein generated equivalent neutralizing antibody titres and were as resistant to CDV challenge as dogs immunized with a replication-competent vaccinia virus-measles HA recombinant [11].

ALVAC recombinants have also protected other mammalian target species against infectious agents. For example, ALVAC-RG protected dogs and cats against rabies [27], an ALVAC recombinant expressing the EIV type A1 and type A2 HA glycoproteins protected horses against EIV [28] and an ALVAC recombinant expressing the feline leukaemia virus (FeLV) *gag* and *env* proteins protected cats against FeLV [29].

Immune responses generated by NYVAC or ALVAC recombinants

Although avipoxvirus recombinants do not replicate in non-avian species, *de novo* synthesis of the recombinant protein is necessary to induce an immune response against the recombinant protein. Animals inoculated with a fowlpox recombinant expressing the rabies glycoprotein produced antibodies against rabies. However, animals inoculated with an inactivated fowlpox-rabies glycoprotein recombinant produced antibodies against the fowlpox vector, but not against rabies. Therefore, the rabies-specific immune response elicited by this recombinant was induced by the rabies protein expressed *de novo* in the infected cell and not by the rabies protein introduced with the inoculated virus [26].

Humoral immunity. Although there are exceptions (see below), most ALVAC and NYVAC recombinants elicit a strong humoral response against the recombinant antigen [11, 18, 20, 26, 30]. In fact, NYVAC and ALVAC recombinants can elicit neutralizing antibody titres equivalent to a comparable replication-competent vaccinia virus recombinant [11, 18].

Cell-mediated immunity. Although ALVAC and NYVAC have a restricted or debilitated replicative capacity in mammalian cells, recombinants generated from these vectors can elicit cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) in humans [31]. Data from Phase I clinical trials indicate that some individuals inoculated with an ALVAC recombinant expressing the human immunodeficiency virus type 1_{MN} (HIV1_{MN}) envelope glycoprotein and many individuals inoculated with the ALVAC-HIV1_{MN} envelope glycoprotein recombinant and boosted with HIV1 gp160 or gp120 subunit protein generated CD8⁺ CTLs [31, 32]. Furthermore, the protocol of priming with an ALVAC recombinant and boosting with a subunit protein consistently allowed the demonstration of circulating CTLs in a higher percentage of individuals than protocols with the subunit preparation alone [32]. These results indicate that immunization with a non-replicating poxvirus vector, either alone or as part of a prime-boost regime, can elicit CTLs in humans.

Correlates of protection. Immunization with an ALVAC recombinant expressing the FeLV *gag* and *env* proteins protected all 6/6 cats against an FeLV challenge. Immunization with an ALVAC recombinant expressing the FeLV *gag* protein and a form

of *env* from which the putative immunosuppressive region had been deleted protected 3/6 cats. Serological analyses indicated that none of the 12 immunized cats had detectable titres of FeLV neutralizing antibodies prior to challenge. However, whereas all the protected cats generated neutralizing antibodies 9–12 weeks after challenge, none of the cats that became infected developed neutralizing antibodies, even after challenge. Therefore, protection against FeLV was induced without detectable neutralizing antibodies at the time of challenge [29]. These results suggest that protection may be associated with a primed immune response that was quickly recalled upon challenge. Of course, the role of cell-mediated immunity may also be of critical importance.

ALVAC recombinants have also protected other species against infectious agents despite the lack of detectable neutralizing antibodies at the time of challenge. For example, dogs inoculated with an ALVAC recombinant expressing the measles virus fusion glycoprotein survived a lethal CDV challenge despite having no detectable CDV-specific neutralizing antibodies [11]. In addition, 11/12 dogs resisted a rabies challenge 36 months after being inoculated with ALVAC-RG, even though rabies-specific neutralizing antibody titres were not detectable at the time of challenge [33]. Therefore, in three separate studies, protective immunity was induced even though neutralizing antibodies were not detectable at the time of challenge. The latter study also indicates that an ALVAC recombinant can induce long-lasting immunity.

Safety. The attenuated characteristics of NYVAC and ALVAC in cell culture and laboratory animals suggest that these vectors are safe. However, the safety of each candidate vaccine must be evaluated empirically. To date, three NYVAC recombinants and seven ALVAC recombinants have been evaluated in humans. Apart from minor local reactions, there have been no serious side-effects [30, 31, 34]. Therefore, NYVAC and ALVAC appear to be safe and well tolerated in humans.

Effect of prior exposure to poxvirus vectors. Much of the world's population has been exposed to vaccinia virus. Therefore, the efficacy of poxvirus-based recombinants, and in particular, vaccinia virus-based recombinants must be evaluated in vaccinia-immune, as well as vaccinia-naïve individuals. Data from a Phase I clinical trial indicated that immunization with

HIVAC-1e, a replication-competent vaccinia virus recombinant expressing the HIV1_{III_B} envelope glycoprotein, elicited stronger HIV1-specific antibody and lymphoproliferative responses in vaccinia-naïve individuals than vaccinia-immune individuals [35]. On the other hand, the rabies- or HIV1-specific immune responses elicited by ALVAC recombinants expressing either rabies or HIV1_{MN} envelope glycoproteins were equivalent in both vaccinia-naïve and vaccinia-immune individuals [30, 32]. Therefore, prior exposure to vaccinia virus does not appear to effect the ability of ALVAC recombinants to elicit a primary and/or anamnestic immune response. This question is also being addressed with NYVAC recombinants in ongoing clinical studies.

Interference from maternal immunity. One problem encountered when vaccinating very young individuals is interference from maternal antibodies. For example, vaccination of children less than 12 months old with attenuated measles vaccine does not consistently produce protective immunity and can impair successful revaccination as measured by the induction of antibody. In developed countries, where the risk of being exposed to measles virus is low, children are usually vaccinated at 15 months when maternal antibody levels have waned. In developing countries, however, where the risk of measles virus is much higher, there is a critical window of susceptibility when maternal antibody is too low to be protective, but yet too high to allow successful vaccination.

To determine whether an ALVAC recombinant could elicit a protective immune response in the presence of maternal antibodies, a rabies challenge study was done in newborn puppies. To ensure that the newborns had high levels of maternal antibodies, immune pregnant bitches were boosted with inactivated rabies vaccine 2 weeks before giving birth. Four weeks later, pups with high levels of rabies antibodies were vaccinated with ALVAC-RG. No significant increase in rabies antibodies were observed. At 3 months, when maternal antibody had waned, the pups were challenged with rabies virus. All four dogs vaccinated with a high dose of ALVAC-RG and 2/4 dogs vaccinated with a low dose of ALVAC-RG survived, whereas 0/4 unvaccinated dogs survived [33]. These results indicate that an ALVAC recombinant can elicit protective immunity in the presence of high levels of maternally-derived antibodies.

Mucosal immunity. Many pathogens infect a host via

Table 2. *Protective non-replicating poxvirus recombinants*

Pathogen	Strain	Target species
Canine distemper virus	ALVAC	Dogs
Equine influenza virus	NYVAC	Horses
Equine influenza virus	ALVAC	Horses
Feline leukemia virus	ALVAC	Cats
Japanese encephalitis virus	NYVAC	Pigs
Pseudorabies virus	NYVAC	Pigs
Rabies virus	ALVAC	Dogs
Rabies virus	ALVAC	Cats

a mucosal surface. Therefore, mucosal immunity is an important component of a protective immune response. Parenteral administration of NYVAC or ALVAC recombinants can protect target species individuals against a mucosal challenge. An ALVAC-FeLV *gag/env* recombinant protected cats against an oronasal FeLV challenge, an ALVAC-measles HA recombinant protected dogs against an intranasal CDV challenge, NYVAC-PRV gB and NYVAC-PRV gD recombinants protected pigs against an oronasal PRV challenge and an ALVAC-EIV HA recombinant and a NYVAC-EIV HA recombinant protected horses against a natural EIV infection, which is assumed to have been transmitted via the oronasal route [11, 19, 20, 29].

Use of poxviruses in immunotherapy/gene therapy

Cancer

Non-replicating poxvirus recombinants have been used prophylactically to vaccinate animals against a variety of infectious agents (Table 2). Poxvirus vectors can also be used in a variety of immunotherapeutic protocols to induce or potentiate immune responses against tumours or infectious agents. For example, many tumours express tumour-associated antigens (TAAs) that can act as immunological targets. Unfortunately, the immune response against TAAs is usually weak or non-existent. However, expression of a TAA in the context of a biological response modifier (BRM) could potentially increase the immunogenicity of that TAA. Therefore, parenteral or intratumoural inoculation with a poxvirus recombinant co-expressing BRMs (e.g., cytokines, B7-1, B7-2) and a TAA from a patient's tumour may induce an immune response capable of controlling or preventing the growth of the patient's tumour.

Systemic administration of BRMs, such as IL-2, have resulted in clinically significant tumour regression [36]. Unfortunately, toxicity associated with the systemic administration of high doses of BRMs, such as IL-2, has limited the utility of cytokine treatments. To circumvent these problems, the potential delivery of efficacious, nontoxic levels of cytokines via a viral vector has been investigated. Poxvirus vectors could therefore be used as part of a cell-based immunotherapeutic protocol in which tumour cells or tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are infected with a poxvirus-TAA/BRM recombinant *ex vivo* and then reintroduced into the patient.

Expression of BRMs in tumour cells has increased the immunogenicity of weakly immunogenic TAAs. Mice injected with a mixture of uninfected murine colonic adenocarcinoma cells (MC38) and MC38 cells infected with a replication-competent vaccinia virus recombinant expressing the murine T-cell co-stimulatory molecules, B7-1 or B7-2, did not develop tumours, whereas mice injected with MC38 cells or a mixture of uninfected and vaccinia virus-infected MC38 cells did develop tumours. Furthermore, when the protected mice were rechallenged on the opposite flank with uninfected MC38 cells 40 days after the initial challenge, tumour formation was significantly delayed and the growth rate of the tumour substantially reduced [37].

Similar studies have also been performed with mouse bladder tumour cells (MBT-2). Mice injected with a mixture of uninfected MBT-2 cells and MBT-2 cells infected with ALVAC recombinants expressing GM-CSF, IL-12 or TNF- α did not develop tumours, whereas tumours did develop in mice injected with a mixture of uninfected and ALVAC-infected MBT-2 cells. In addition, 80% of the mice injected with a mixture of uninfected MBT-2 cells and ALVAC-IL-2-infected MBT-2 cells did not develop tumours. Furthermore, tumour-specific cytolytic activity was observed in mice injected with ALVAC-IL-2-infected MBT-2 cells (Rao et al., unpublished results). These two studies indicate that expression of a BRM in a tumour cell via a poxvirus recombinant can prime a tumour-specific immune response capable of rejecting or delaying tumour formation.

Poxvirus vectors have also been used to stimulate and expand tumour-specific CTLs/TILs *ex vivo*. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from a cancer patient with no detectable tumour-specific CTL activity. The PBMCs were infected with an ALVAC-MAGE-1 recombinant and

used *in vitro* to stimulate TILs isolated from a tumour from the same patient. (MAGE-1 is a human TAA [38].) After amplification, MAGE-1-specific CTL activity was identified [39]. Therefore, an ALVAC-TAA recombinant was able to stimulate and expand TAA-specific CTLs from a cancer patient with no prior detectable TAA-specific cytolytic activity.

Infectious agents

ALVAC and NYVAC recombinants have also been used to stimulate and expand HIV1 envelope-specific CTLs from HIV1-seropositive individuals with undetectable or low levels of envelope-specific CTL activity. PBMCs from HIV1-seropositive individuals were infected with an ALVAC-HIV1 envelope recombinant or a NYVAC-HIV1 envelope recombinant. The infected cells were then used to stimulate *in vitro* uninfected PBMCs from the same individual. Following this procedure, the stimulated PBMCs had a high level of envelope-specific CD8+ cytolytic activity. Furthermore, the cytolytic activity of these cultures was higher than that of a culture stimulated with a replication-competent vaccinia virus-HIV1 envelope recombinant [40]. Therefore, ALVAC and NYVAC recombinants can be used to preferentially stimulate and expand specific CTL populations *ex vivo*, which could then be reintroduced into the donor to hopefully provide a therapeutic benefit.

ADENOVIRUSES

Adenoviruses are relatively large (30–40 kb) double-stranded DNA viruses. Individual members have been isolated from numerous mammalian and avian species. Clinical symptoms associated with adenovirus infection depend on the serotype, but are usually mild and rarely life-threatening. An attenuated adenovirus type 4 and type 7 vaccine has been used by the US military for the past 30 years to prevent respiratory disease in recruits. Attenuated veterinary vaccines are also used to protect against adenovirus-associated disease. The success of these vaccines has prompted the development of adenoviruses as recombinant vectors [41].

Adenoviruses have many properties advantageous for a potential vector. They are easily grown and concentrated to high titres. They can infect a broad spectrum of cells, including epithelial, liver and lung cells. Adenovirus recombinants can be easily generated using plasmids containing viral DNA [42]. In

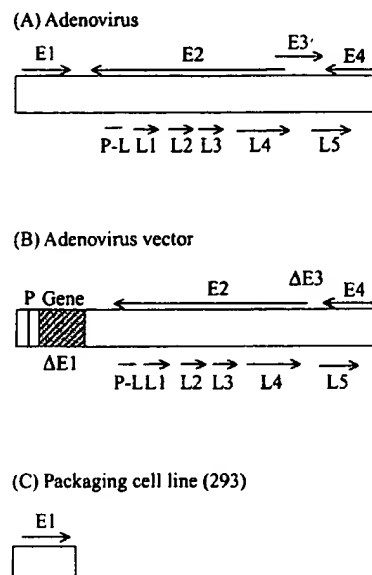


Fig. 1. Recombinant adenovirus vector system. (A) Transcription map of a typical adenovirus. Early (E) and late (L) transcripts, encoding the adenovirus non-structural and structural proteins are represented by arrows. Each transcription unit gives rise to a family of mRNAs via differential splicing events. The early genes have individual promoters. The late genes are transcribed from a single late promoter (P-L). The inverted terminal repeats (ITR) contain the regulatory sequences necessary for replication and genomic encapsidation. (B) Typical helper-free, replication-defective adenovirus vector. The foreign gene is cloned into the E1 region under the transcriptional control of an internal promoter (P). To increase cloning capacity, the E3 region has been deleted. (C) Adenovirus packaging cell line. Helper-free, replication-defective adenovirus recombinants are propagated in 293 cells, which express the E1 region constitutively. (Modified from ref. 87).

addition, adenoviruses replicate in the nucleus of the infected cell. Therefore, expression of foreign genes can utilize eucaryotic promoters, such as the adenovirus E1a promoter, the cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter or the Rous sarcoma virus (RSV) LTR promoter [43–45]. Furthermore, adenovirus vaccines can be administered either orally, in an enteric-coated capsule, or intramuscularly.

Three types of adenovirus recombinants can be generated; (1) replication-competent; (2) helper-free, replication-defective and (3) helper-dependent, replication-defective. The type of adenovirus recombinant generated depends on the insertion locus used to generate the recombinant and the adenovirus sequence retained in the subsequent virus. For example, insertion of exogenous sequence into the non-essential E3 region results in the generation of a replication-competent recombinant virus (Fig. 1A).

On the other hand, insertion into the essential E1 region results in the generation of a helper-free, replication-defective recombinant (Fig. 1B) that can be propagated in a cell line (293) that expresses the E1 gene products (Fig. 1C). Deletion of large amounts of adenovirus DNA results in the generation of a helper-dependent, replication-defective recombinant. Propagation of helper-dependent, replication-defective recombinants requires the presence of a helper adenovirus to supply the viral structural and enzymatic functions lacking in the recombinant [41].

The amount of foreign DNA that can be packaged into an adenovirus recombinant depends on the type of recombinant desired. An adenovirus capsid can package DNA equivalent to 105% of a typical adenovirus genome. The packaging capacity, however, can be increased by deleting various regions of the adenovirus genome. For example, a replication-competent recombinant from which the non-essential E3 and E4 regions are deleted can contain 5–6 kb of foreign DNA. On the other hand, a helper-free, replication-defective adenovirus recombinant from which the non-essential E3 and E4 regions and the essential E1 region are deleted can contain 7–8 kb of foreign DNA. Of course, by deleting the whole adenovirus genome except the inverted repeats and packaging signal sequence, more than 30 kb of foreign DNA can be inserted into a helper-dependent, replication-defective recombinant [41].

Vaccines

Immunization with adenovirus recombinants can protect individuals against a subsequent infectious challenge. For example, a replication-competent adenovirus type 5 (Ad5) recombinant expressing the spike or nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus (MHV) protected mice against MHV [46] and a replication-competent Ad5 recombinant expressing the rabies glycoprotein protected mice against rabies [47].

However, adenovirus vectors do have potential disadvantages. For example, like other live viral vectors, they may cause disseminated disease in immunocompromized individuals [48]. Adenoviruses may also be excreted by oro-faecal and respiratory routes for months or years following infection. In fact, horizontal transmission of the adenovirus type 4 vaccine has been observed between married couples [49] and between vaccinated children and family

members [50]. In addition, cotton rats inoculated intranasally with an Ad5 recombinant containing a deletion in the E3 region exhibited an increased pulmonary inflammatory response compared to mice inoculated with wild-type virus [51]. On the other hand, oral administration of chimpanzees and humans with other Ad5 recombinants containing an E3 deletion did not induce an increased inflammatory response [52, 53].

The diffusion of replication-deficient adenoviruses is very low. Therefore, in the hope of developing a safer vector, replication-defective adenoviruses have been evaluated as potential recombinant vaccine vectors. Inoculation with a replication-defective adenovirus recombinant expressing the EBV envelope glycoprotein protected cottontop tamarins against EBV [54]. In addition, immunization with a replication-defective adenovirus recombinant expressing the PRV gD envelope glycoprotein protected cotton rats against a PRV challenge. However, the protective dose of the replication-defective adenovirus-PRV gD recombinant was 1000X higher than that of a replication-competent adenovirus-PRV gD recombinant [55]. Therefore, in this model system, the potency of an adenovirus recombinant was adversely affected by the replicative capacity of the vector.

Immunotherapy/gene therapy

Classical genetic diseases

Helper-free, replication-defective adenoviruses have many properties theoretically useful for gene therapy [41]. In particular, adenovirus recombinants can efficiently transduce non-dividing cells *in vivo*. Therefore, since many potential targets for gene therapy are tissues that are either slow growing, terminally differentiated or difficult to remove and reimplant, adenoviruses are attractive vectors. On the other hand, adenovirus vectors do have some disadvantages for gene therapy. For example, since the adenovirus genome does not integrate into the chromosome of the transduced cell, the vector is eventually lost as cell division proceeds.

Cystic fibrosis (CF) is a hereditary disorder caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. Although mutations in CFTR cause a variety of abnormalities, the most severe is chronic mucus production and resulting infection at the epithelial surface of the lung. The complexity of the lung does not allow dissection and

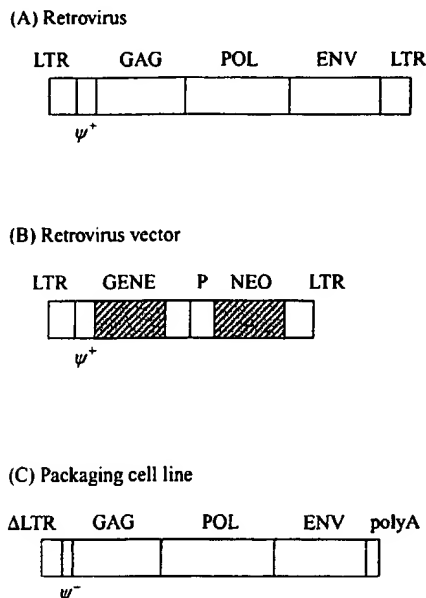


Fig. 2. Recombinant retrovirus vector system. (A) Replication-competent retrovirus genome. GAG encodes the capsid proteins, POL encodes the reverse transcriptase and integrase proteins and ENV encodes the envelope glycoprotein. The long terminal repeat (LTR) contains regulatory sequences, such as a promoter and transcription termination sequence. Ψ^+ represents the packaging signal sequence. (B) Typical replication-defective, double-expression retrovirus vector. The foreign gene is under the transcriptional control of the LTR promoter. The selectable marker gene (NEO) is under the transcriptional control of an internal promoter (P). (C) Retrovirus packaging cell line. Retrovirus recombinants are propagated in a cell line that expresses the GAG, POL and ENV gene products. Ψ^- indicates that the packaging signal sequence has been deleted. PolyA represents a polyadenylation signal sequence. (Modified from ref. 87).

reimplantation of genetically engineered lung cells. Furthermore, most of the epithelial cells on the lung surface are terminally differentiated. Therefore, reconstitution of pulmonary function via gene therapy must be accomplished with a vector that can transduce non-replicating cells *in vivo*.

Helper-free, replication-defective adenovirus recombinants expressing the CFTR gene have been inoculated directly into the airway of numerous species, including humans [43, 56, 57]. In each case, successful gene transfer was observed. However, expression of CFTR was transient and loss of expression associated with pulmonary inflammation. In a recent clinical trial [58], an adenovirus-CFTR recombinant was administered at four different doses to the nasal epithelium of 12 CF patients. The CFTR gene was detected in 4/6 patients receiving the higher doses and

1/6 patients receiving the lower doses. The percentage of transduced cells, however, was very low (< 1%). Furthermore, analysis of the epithelium revealed no functional restoration of CFTR activity. In addition, although toxicity was not observed in patients receiving the lower doses, mucosal inflammation was observed in 2/3 patients receiving the highest dose. Therefore, in this study, administration of an adenovirus-CFTR recombinant to the nasal epithelium of CF patients did not restore CFTR activity and resulted in mucosal inflammation.

Haemophilia B is a hereditary disorder caused by a deficiency of blood coagulation factor IX. This disease affects approximately 1/30000 caucasian males and results in episodes of severe bleeding. Although numerous tissues have been targeted for factor IX gene therapy [59–61], the liver, being the normal site of factor IX synthesis, represents the most natural target.

Injection of a helper-free, replication-defective adenovirus-canine factor IX recombinant into the portal vein of haemophilic dogs resulted in the transduction of a significant percentage of liver cells. In fact, plasma levels of factor IX increased from 0 to 300% of normal levels and resulted in the complete amelioration of symptoms. Unfortunately, expression of factor IX was transient. Levels started to decline after 2 days and after 1–2 months had fallen below therapeutic levels [44].

The results observed in the CFTR and factor IX studies are not unique. In most instances, the use of helper-free, replication-defective adenovirus recombinants resulted in transient expression of the transduced gene and pathology of the target organ. Stable expression of recombinant adenovirus-transduced genes has only been observed in newborn mice [62], immunodeficient or immunocompromized animals [44] or immunoprivileged organs, such as the retina [63]. These results suggest that the immune system is involved in the inability to establish long-term expression of recombinant adenovirus-transduced genes.

Helper-free, replication-defective adenoviruses express viral proteins in non-293 cells when infected at high multiplicities of infection [64]. Viral-specific class I-restricted CTLs have also been shown to mediate the destruction of hepatocytes transduced with helper-free, replication-defective adenovirus recombinants [65]. Therefore, it appears that the expression of viral proteins in recombinant adenovirus-transduced cells trigger an immune response against the transduced

cells that is responsible for the transient expression and pathology observed with these vectors.

In order to minimize viral expression and prolong expression of transduced genes, second generation adenovirus vectors containing mutations in E2a and E1 have been constructed. Although deletion of these genes did not completely abolish viral expression, animals inoculated with recombinants made from these vectors exhibited less inflammation and longer expression of the transduced gene than animals inoculated with E2a+ recombinants [66, 67]. Therefore, improvements may eventually overcome the problems associated with adenovirus vectors.

Cancer

Adenovirus vectors can also be used to potentiate an immune response against tumour cells. Expression of BRMs in tumour cells via an adenovirus vector can induce a tumour-specific immune response capable of suppressing tumour growth. For example, most of the mice injected with mouse mastocytoma cells (P815) infected with a helper-free, replication-defective adenovirus recombinant expressing murine IL2 did not develop tumours, whereas mice injected with uninfected P815 cells did develop tumours. Furthermore, the protected mice did not develop tumours when rechallenged with uninfected P815 cells [68]. These results indicate that tumour cells infected with an adenovirus-BRM recombinant primed a tumour-specific immune response capable of suppressing tumour formation.

This form of immunotherapy has also been shown to be efficacious against established tumours. Up to 75% of mice injected with the adenovirus-IL-2 recombinant directly into an established P815 tumour cleared the tumour. Furthermore, the protected mice did not develop tumours when rechallenged with uninfected P815 cells [69]. Therefore, intratumoural injection of an adenovirus-BRM recombinant elicited an immune response capable of clearing an established tumour.

RETROVIRUSES

Retroviruses are a family of single-stranded RNA viruses. During the life cycle of these viruses, the normal flow of genetic information, from DNA to RNA, is reversed. Following infection, the single-stranded RNA genome of retroviruses is converted to double-stranded DNA by a retrovirus-encoded reverse transcriptase. The double-stranded DNA is then

incorporated into the host cell chromosome by a retrovirus-encoded integrase. The ability to insert DNA into the genome of infected cells makes retroviruses ideal eucaryotic expression vectors [70].

The genomic organization of a simple retrovirus is shown in Fig. 2A. The *gag* gene encodes the core structural proteins, the *pol* gene encodes the reverse transcriptase and integrase proteins and the *env* gene encodes the outer membrane envelope glycoprotein. These genes are flanked by long terminal repeats (LTRs) which contain numerous regulatory sequences, including a promoter.

The generation of retrovirus recombinants can be divided into two components; the retrovirus vector (Fig. 2B) and the retrovirus packaging cell line (Fig. 2C). The retrovirus vector encodes the foreign gene product and a packaging signal sequence (ψ), but does not encode any of the enzymatic or structural proteins (i.e., *gag*, *pol* and *env*) required for the production of infectious particles. The retrovirus packaging cell line, on the other hand, encodes the enzymatic and structural proteins required for the production of infectious particles, but does not contain a packaging signal sequence. Recombinant retroviruses are generated by transfecting retrovirus packaging cells with retrovirus vector DNA [70].

Numerous retrovirus vectors have been generated. Early vectors contained a packaging signal sequence and a single foreign gene. Subsequent vectors were designed to (1) allow easy selection of transductants; (2) increase virus production and foreign gene expression and (3) decrease the potential of generating a replication-competent virus. For example, to allow easy selection of transductants, vectors that express two foreign genes (one of which is a selectable marker, such as neomycin resistance) have been generated. Vectors that express two genes can utilize either one or two promoters. A single promoter, such as the LTR promoter, can express two genes by a differential splicing mechanism. The main disadvantage of this type of vector is that splicing is not always efficient, therefore, expression of the foreign genes is not always consistent. A single promoter can also express two genes by utilizing an internal ribosome entry site (IRES). (An IRES is a sequence isolated from picornaviruses that allows cap-independent translation [71]). The most common type of double expression vector, however, utilizes two promoters (Fig. 2B).

Numerous retrovirus packaging cell lines, expressing avian, murine or primate retrovirus gene products

have been generated. Cell lines encoding murine retrovirus gene products are the most commonly used due to the wide range of cell tropisms of different murine retroviruses. For example, for human applications, a retrovirus capable of infecting human cells could be used.

Early packaging cell lines contained a cDNA copy of a retrovirus genome with the packaging signal sequence deleted. However, since recombination between a retrovirus vector containing a packaging signal sequence and the retrovirus sequence in the packaging cells could result in the production of a replication-competent retrovirus, subsequent packaging cells contain additional modifications. For example, the PA3127 packaging cell line contains a mutation in the 5' LTR and replaces the 3' LTR with the simian virus SV40 polyadenylation signal sequence [72].

Vaccines

Very little work has been done to develop retroviruses as vaccine vectors. In one study, chickens inoculated with a replication-competent RSV recombinant expressing the avian influenza HA glycoprotein were protected against avian influenza [73]. These results indicate that retroviruses could potentially be used as recombinant vaccine vectors.

Immunotherapy/gene therapy

Classical genetic diseases

Adenosine deaminase (ADA) deficiency is a very rare genetic disease. Individuals with this disease lack a functional form of ADA, an enzyme involved in the purine salvage pathway. In the absence of ADA, deoxyadenosine can accumulate to levels that are toxic to certain types of cells, such as T-lymphocytes, and results in severe immunosuppression.

In 1990, ADA deficiency became the first disease to be treated by gene therapy [74]. T-cells isolated from two ADA patients were transduced with a retrovirus recombinant expressing the ADA gene. The transduced cells were expanded *in vitro* and transfused back into the patients. Four years after treatment began and 2 years after treatment was completed, > 50% of one patient's circulating T-cells and 0.1–1% of the other patient's T-cells contained the new ADA gene [75]. In the 2 years following treatment, the number of T-cells containing the new gene remained constant, suggesting that the transduced T-cells were

either long-lived or proliferating. The two individuals have also responded positively in *in vivo* and *in vitro* immunological assays (e.g. DTH skin tests, antibody production, IL-2 production and T-cell-mediated cytotoxicity). Although these patients are given routine injections of synthetic ADA, these results suggest that gene therapy has been beneficial.

Retrovirus vectors have also been used to deliver genes to the liver. When a retrovirus-canine factor IX recombinant was injected into the portal vein of haemophilic dogs 1–3 days after partial hepatectomies, low levels of factor IX were expressed for more than 5 months, resulting in modest improvements in blood clotting efficiencies [76].

Although encouraging, human applications would require greater expression of factor IX. In addition, the surgical invasiveness of this protocol is far from ideal. Surgical removal of part of the liver is necessary because (1) *in vivo* transduction of liver cells with a retrovirus recombinant is very inefficient and (2) *ex vivo* manipulations affect the transplantation capacity of explanted hepatocytes [77]. *In vivo* transduction is inefficient because most hepatocytes in the adult liver are quiescent and retroviruses can only integrate into the genome of actively dividing cells. However, following a partial hepatectomy, the remaining liver cells actively divide until the liver is fully regenerated. Therefore, under these conditions, *in vivo* transduction of liver cells with a retrovirus recombinant can be accomplished [78].

Efforts to overcome the restricted host-range of retrovirus vectors has led to the development of pseudotyped retrovirus vectors [79]. Pseudotyped retroviruses contain the genome of one virus and the envelope protein of another virus. Since the host range of these viruses is associated with the envelope protein, a pseudotyped retrovirus can have a much broader host-range than an unmodified retrovirus. For example, a pseudotyped retrovirus (VSV) vector has been used to transduce newborn mouse liver cells *in vivo* [80]. These results suggest that continued improvements may eventually overcome the inherent limitations associated with retrovirus vectors.

Cancer

Approximately half of the human gene therapy clinical trials have involved cancer. In general, these protocols are designed to enhance tumour-specific immune responses. The rationale is based on results from animal studies in which recombinant retrovirus-transduced cells elicit a tumour-specific immune

response capable of preventing tumour formation. For example, mice inoculated with murine neuroblastoma (C1300) cells transduced with a retrovirus recombinant expressing IFN- γ did not develop tumours, whereas mice inoculated with non-transduced C1300 cells did [81]. This protection was dependent on the level of IFN- γ produced by the transduced cells. Mice inoculated with transduced C1300 cells expressing low levels of IFN- γ developed tumours, whereas mice inoculated with transduced C1300 cells expressing high levels of IFN- γ did not. Consistent with these results, injection of a monoclonal antibody against IFN- γ abrogated the protection elicited by the transduced cells.

The immune response generated by the transduced cells was adoptive and tumour-specific. Mice inoculated with non-transduced C1300 cells 4–6 weeks after clearing the recombinant retrovirus-transduced C1300 challenge did not develop tumours, whereas mice inoculated with murine fibrosarcoma (Sa-1) cells 4–6 weeks after clearing the recombinant retrovirus-transduced C1300 challenge did develop tumours [81].

Very similar results were observed in another murine system [82]. Mice inoculated with murine fibrosarcoma (CMS-5) cells transduced with a retrovirus-IL-2 recombinant did not develop tumours, whereas tumours did develop in mice inoculated with non-transduced CMS-5 cells. Protection was dependent on the level of IL-2 produced. Mice inoculated with transduced CMS-5 cells expressing low levels of IL-2 developed tumours, whereas mice inoculated with transduced CMS-5 cells expressing high levels of IL-2 did not. Furthermore, mice injected with a mixture of non-transduced CMS-5 cells and recombinant retrovirus-transduced CMS-5 cells did not develop tumours. The protection generated in this system is also adoptive and tumour-specific. Mice inoculated with non-transduced CMS-5 cells 6 weeks after clearing the recombinant retrovirus-transduced CMS-5 challenge did not develop tumours, whereas tumours did develop in mice inoculated with two other murine fibrosarcoma cells.

In another murine system, mice inoculated with murine melanoma (B16) cells transduced with a retrovirus recombinant expressing IL-2 did not develop tumours, whereas mice inoculated with non-transduced B16 cells, or B16 cells transduced with retrovirus recombinants expressing IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-1RA, ICAM or CD2 did develop tumours [83]. Furthermore, due to the progressively increasing number of cells expressing cytokines, mice receiving some of the recombinant

retrovirus-transduced cells developed fatal, cytokine-related pathologies.

To avoid the potential dangers associated with inoculation of cytokine-producing tumour cells, the immunogenicity of irradiated recombinant retrovirus-transduced tumour cells was evaluated [83]. All the mice inoculated with irradiated B16 cells transduced with a retrovirus-GM-CSF recombinant and about half the mice inoculated with irradiated B16 cells transduced with retrovirus-IL-4 or retrovirus-IL-6 recombinants did not develop tumours when challenged with non-transduced B16 cells 7 days later. On the other hand, mice inoculated with irradiated B16 cells transduced with retrovirus recombinants expressing IL-2, IL-5, IFN- γ , TNF- α , IL-1RA, ICAM or CD2 did develop tumours when challenged with non-transduced B16 cells.

Inoculation with irradiated retrovirus-GM-CSF-transduced tumour cells also enhanced tumour-specific immunity in other murine systems. For example, mice inoculated with irradiated colon carcinoma (CT-26) cells, irradiated fibrosarcoma (CMS-5) cells or irradiated renal carcinoma (RENCA) cells transduced with the retrovirus-GM-CSF recombinant did not develop tumours when challenged with non-transduced tumour cells 1–3 weeks later. Furthermore, the protection was long-lasting. Most of the mice inoculated with the irradiated retrovirus-GM-CSF-transduced B16 cells did not develop tumours when challenged with non-transduced B16 cells several months later. Protection was mediated by CD4+ and CD8+ T-cells, but not by NK cells. Depletion of CD4+ or CD8+ cells abrogated protection, whereas depletion of NK cells had little or no effect.

The therapeutic application of recombinant retrovirus-transduced tumour cells may be limited by the inability to culture and transduce every type of tumour. Unlike many tumour cells, fibroblasts are easily cultured and transduced. Therefore, the potential of utilizing transduced fibroblasts to elicit a tumour-specific immune response was investigated [84]. Mice inoculated with a mixture of CT-26 cells and recombinant retrovirus-IL-2-transduced murine fibroblasts developed tumours at a lower incidence than mice inoculated with CT-26 cells alone. Furthermore, mice inoculated with a mixture of irradiated CT-26 cells and recombinant retrovirus-IL-2-transduced fibroblasts 2 weeks before a CT-26 challenge developed tumours at a lower incidence than mice inoculated with irradiated CT-26 cells alone.

Animal studies suggest that this form of immunotherapy may also be effective against preexisting tumours. Most of the mice inoculated with irradiated recombinant retrovirus-GM-CSF-transduced B16 cells 3 days after being inoculated with nontransduced B16 cells did not develop tumours [83]. In addition, about half of the mice multiply inoculated with a mixture of irradiated CT-26 cells and recombinant retrovirus-IL-2-transduced fibroblasts 3 days after being inoculated with CT-26 cells were able to clear a visible tumour. On the other hand, mice could not clear a tumour when recombinant retrovirus-IL-2-transduced fibroblasts were inoculated as close to the tumour as possible [84].

The results of these studies indicate that the production of cytokines in the microenvironment of tumour cells via a retrovirus recombinant can enhance tumour-specific immunity and potentially prevent tumour formation.

DISCUSSION

A wide variety of eucaryotic expression vectors have been developed. This review has focused on three of these vectors; poxviruses, adenoviruses and retroviruses. The biological characteristics of these viruses make them more or less suited for different applications (Table 3). For example, numerous attenuated poxvirus and adenovirus vaccines have been developed to control poxvirus and adenovirus diseases in humans and domestic animals. The success of these vaccines has prompted the development of recombinant poxvirus and adenovirus vaccine vectors. However, before these vectors can be universally accepted, certain safety issues have to be addressed. For example, like all live vaccines, poxvirus and adenovirus recombinants have the potential to elicit adverse reactions in immunocompromized individuals due to the unrestricted growth of the vector. In response to these concerns, the efficacy of replication-defective vectors has been investigated.

Two highly attenuated poxvirus vectors, NYVAC and ALVAC, have been developed. Recombinants generated from these vectors are safe and elicit humoral and cell-mediated immune responses capable of protecting target species individuals against infectious agents. In addition, protection studies indicate that replication-defective poxvirus recombinants can be as efficacious as replication-competent poxvirus recombinants. Therefore, NYVAC and

Table 3. *Potential applications of non-replicating vectors*

Vector	Vaccine	Immunotherapy/gene therapy
Poxviruses	+	+ / -
Adenoviruses	+ / -	+
Retroviruses	-	+

Table 4. *Relative advantages and disadvantages of gene therapy vectors*

Vector	Advantages	Disadvantages
Adenoviruses	Can transduce non-replicating cells	Transient expression
	Can transduce cells <i>in vivo</i>	Toxicity
Retroviruses	Genomic integration	No genomic integration
		Can't transduce non-replicating cells
		<i>Ex vivo</i> transduction usually required

ALVAC represent safer alternatives to previous poxvirus vectors.

A replication-defective adenovirus vaccine vector has also been developed. However, one study indicated that a replication-defective adenovirus recombinant was not as efficacious as a replication-competent adenovirus recombinant. Therefore, replication-defective adenovirus vaccines may not be an alternative to replication-competent adenovirus vaccines.

All of the vectors discussed in this review have some application in gene therapy. However, due to the biological characteristics of these viruses, different vectors have different advantages and disadvantages (Table 4). For example, retroviruses cannot integrate into the genome of non-dividing cells. Therefore, retrovirus vectors cannot transduce terminally differentiated, non-proliferating cells. In addition, in most instances, retrovirus vectors do not efficiently transduce cells *in vivo*. Therefore, these vectors are not readily amenable to transducing complex organs, such as the lung. The inability of retrovirus vectors to be used *in vivo* requires that target cells be removed from the body; a procedure that can be unacceptably invasive. Therefore, the usefulness of retrovirus

vectors
many
Ad
terms
the
imm
these
reco
Al
aden
virus
virus
(AA
virus
parti
expre
A
infect
cells
a he
virus
integ
a late
infect
a wi
make
[85].
epith
inoc
There
non-
term
Altho
pack
ineff
needs
vecto
Al
poten
gene
the p

REF

1. P
c
fa
v
2. M
se
P

vectors are often limited by the cell type to be manipulated.

Adenovirus vectors can transduce non-replicating, terminally differentiated cells *in vivo*. However, due to the expression of viral proteins and subsequent immune response against adenovirus-transduced cells, these vectors are often toxic and expression of the recombinant protein transient.

Although this review has focused on poxvirus, adenovirus and retrovirus vectors, numerous other viruses, including herpesviruses, picornaviruses, alphaviruses, paramyxoviruses, adeno-associated virus (AAV), bovine papilloma virus and hepatitis delta virus have been developed as virus vectors. AAV, in particular, has several properties advantageous for a expression vector.

AAV is a defective, human parvovirus which can infect a broad spectrum of dividing and non-dividing cells. Productive replication requires co-infection with a helper virus, such as adenovirus or herpes simplex virus (HSV). In the absence of helper virus, AAV integrates into the host genome, where it persists in a latent state until rescued by an adenovirus or HSV infection. The ability to integrate into the genome of a wide variety of dividing and non-dividing cells makes AAV an attractive eucaryotic expression vector [85]. In fact, CFTR expression was observed in the epithelial cells of a rabbit lung 6 months after being inoculated with an AAV-CFTR recombinant [86]. Therefore, AAV vectors can successfully transduce non-replicating cells *in vivo* and can promote the long-term expression of potentially therapeutic proteins. Although these results are very encouraging, the packaging systems generating AAV recombinants are inefficient and cumbersome. Therefore, more work needs to be performed before AAV is a suitable vector.

All of the vectors discussed in this review have potential application in immunoprophylaxis and/or gene therapy. Hopefully, continued research will allow the potential of these vectors to be realized.

REFERENCES

1. Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 4927-31.
2. Mackett M, Smith G, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 7415-9.
3. Goebel S, Johnson G, Perkus M, Davis S, Winslow J, Paoletti E. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virol* 1990; **179**: 247-66.
4. Perkus M, Goebel S, Davis S, Johnson G, Norton E, Paoletti E. Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virol* 1991; **180**: 406-10.
5. Smith G, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25,000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 1983; **25**: 21-8.
6. Blancou J, Kieny M, Lathe R, et al. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* 1986; **322**: 373-6.
7. Rupprecht C, Wiktor T, Johnston D, et al. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci* 1986; **83**: 7947-51.
8. Brochier B, Kieny M, Costy F, et al. Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* 1991; **354**: 520-2.
9. Pastoret PP, Brochier B. The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies: a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiol Infect* 1996; **116**: (accompanying article).
10. Mackett M, Yilma T, Rose J, Moss B. Vaccinia virus recombinants: expression of VSV genes and protective immunization of mice and cattle. *Science* 1985; **227**: 433-6.
11. Taylor J, Weinberg R, Tartaglia J, et al. Nonreplicating viral vectors as potential vaccines: recombinant canary-pox virus expressing measles virus fusion (F) and hemagglutinin (HA) glycoproteins. *Virol* 1992; **187**: 321-8.
12. Yilma T, Hus D, Jones L, et al. Protection of cattle against rinderpest with vaccinia virus recombinants expressing the HA or F gene. *Science* 1988; **242**: 1058-61.
13. Riviere M, Tartaglia J, Perkus M, et al. Protection of mice and swine from pseudorabies virus conferred by vaccinia virus-based recombinants. *J Virol* 1992; **66**: 3424-34.
14. Bowen R, Short W, Cropp C, et al. Protection of horses immunized with recombinant vaccinia-Venezuelan equine encephalitis vaccine. *Vaccine Res* 1992; **1**: 111-21.
15. Neff, J. Vaccinia virus vaccines: Virulence and attenuation of vaccinia strain variation. In: Quinnan G, ed. *Vaccinia viruses as vectors for vaccine antigens*. New York, New York: Elsevier Science Publishing Co., 1985: 69-75.
16. Morgan A, Mackett M, Finerty S, Arrand J, Scullion F, Epstein M. Recombinant vaccinia virus expressing Epstein-Barr virus glycoprotein gp340 protects cotton-top tamarins against EB virus-induced malignant lymphomas. *J Med Virol* 1988; **25**: 189-95.
17. Tartaglia J, Perkus M, Taylor J, et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virol* 1992; **188**: 217-32.
18. Konishi E, Pincus S, Paoletti E, Laegreid W, Shope R, Mason P. A highly attenuated host range-restricted

- vaccinia virus strain, NYVAC, encoding the prM, E and NS1 genes of Japanese encephalitis virus prevents JEV viremia in swine. *Viol* 1992; **190**: 454-8.
19. Tartaglia J, Cox W, Pincus S, Paoletti E. Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. In: Brown F, ed. *Recombinant vectors in vaccine development*. Dev Biol Stand, Basel: Karger, 1994; **82**: 125-9.
 20. Brockmeier S, Lager K, Tartaglia J, Riviere M, Paoletti E, Mengeling W. Vaccination of pigs against pseudorabies with highly attenuated vaccinia (NYVAC) recombinant viruses. *Vet Micro* 1993; **38**: 41-58.
 21. Esposito J, Knight J, Shaddock J, Novembre F, Bauer G. Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. *Viol* 1988; **165**: 313-6.
 22. Webster R, Kawaoka Y, Taylor J, Weinberg R, Paoletti E. Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine* 1991; **9**: 303-7.
 23. Nazarian K, Lee L, Yanagida N, Ogawa R. Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus. *J Virol* 1992; **66**: 1409-13.
 24. Taylor J, Edbauer C, Rey-Senelonge A, et al. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J Virol* 1990; **64**: 1441-50.
 25. Edbauer C, Weinberg R, Taylor J, et al. Protection of chickens with a recombinant fowlpox virus expressing the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene. *Viol* 1990; **179**: 901-4.
 26. Taylor J, Weinberg R, Languet B, Desmettre P, Paoletti E. Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* 1988; **6**: 497-503.
 27. Taylor J, Trimarchi C, Weinberg R, et al. Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine* 1991; **9**: 190-3.
 28. Taylor J, Tartaglia J, Moran T, et al. The role of poxvirus vectors in influenza vaccine development. In: *Proceedings of the Third International Symposium on Avian Influenza*. University of Wisconsin-Madison Extension Duplicating Services, 1992.
 29. Tartaglia J, Jarrett O, Neil J, Desmettre P, Paoletti E. Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. *J Virol* 1993; **67**: 2370-5.
 30. Cadoz M, Strady A, Meignier B, et al. Immunisation with canarypox virus expressing rabies glycoprotein. *Lancet* 1992; **339**: 1429-32.
 31. Pialoux G, Excler J, Riviere Y, et al. A prime-boost approach to HIV preventive vaccine using a recombinant canarypox virus expressing glycoprotein 160 (MN) followed by a recombinant glycoprotein 160 (MN/LAI). *AIDS Res Hum Retro* 1995; **11**: 373-81.
 32. Egan M, Pazlat W, Tartaglia J, et al. Induction of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a nonreplicating, host-range-restricted canarypox vector (ALVAC) carrying the HIV-1_{MN} env gene. *J Infect Dis* 1995; **171**: 1623-7.
 33. Taylor J, Tartaglia J, Riviere M, et al. Applications of canarypox (ALVAC) vectors in human and veterinary vaccination. In: Brown F, ed. *Dev Biol Stand Basel*: Karger, 1994; **82**: 131-5.
 34. Plotkin S, Cadoz M, Meignier B. The safety and use of canarypox vectored vaccines. *Dev Biol Stand, Basel*, Karger, 1995: 165-70.
 35. Cooney E, Collier A, Greenberg P, et al. Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein. *Lancet* 1991; **337**: 567-72.
 36. Lotze M, Chang A, Seipp C, Simpson C, Vetto J, Rosenberg S. High-dose recombinant interleukin 2 in the treatment of patients with disseminated cancer. *JAMA* 1986; **526**: 3117-24.
 37. Hodge J, Abrams S, Schlom J, Kantor J. Induction of antitumor immunity by recombinant vaccinia viruses expressing B7-1 or B7-2 costimulatory molecules. *Cancer Res* 1994; **54**: 5552-5.
 38. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; **254**: 1643-7.
 39. Toso J, Oei C, Oshidari F, et al. MAGE-1 specific CTLp present among tumor infiltrating lymphocytes from a patient with breast cancer: Characterization and antigen-specific activation. *Cancer Res* 1996; (In press).
 40. Tartaglia J, Taylor J, Cox W, et al. Novel poxvirus strains as research tools and vaccine vectors. In: Koff W, Wong-Staal F, Kennedy R, eds. *AIDS research reviews*. New York: Marcel Dekker, 1993; **3**: 361-78.
 41. Perricaudet M, Stratford-Perricaudet L. Adenovirus-mediated *in vivo* gene therapy. In: Vos J, ed. *Viruses in human gene therapy*. Durham, North Carolina: Carolina Academic Press, 1995: 1-32.
 42. Berkner K, Sharp P. Preparation of adenovirus recombinants using plasmids of viral DNA. In: Gluzman Y, ed. *Eukaryotic viral vectors*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 193-8.
 43. Zabner J, Couture L, Gregory R, Graham S, Smith A, Welsh M. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 1993; **75**: 207-16.
 44. Dai Y, Schwarz E, Gu D, Zhang W, Sarvetnick N, Verma I. Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: Tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1401-5.
 45. Kay M, Landen C, Rothenberg S, et al. *In vivo* hepatic gene therapy: Complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2353-7.
 46. Wesseling J, Godeke G, Schijns V, et al. Mouse hepatitis virus spike and nucleocapsid proteins expressed by

- adenovirus vectors protect mice against a lethal infection. *J Gen Virol* 1993; **74**: 2061-9.
47. Prevec L, Campbell J, Christie B, Belbeck L, Graham F. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *J Infect Dis* 1990; **161**: 27-30.
 48. Krilov L, Rubin L, Frogel M, et al. Disseminated adenovirus infection with hepatic necrosis in patients with human immunodeficiency virus infection and other immunodeficiency states. *Rev Infect Dis* 1990; **12**: 303-7.
 49. Stanley E, Jackson G. Spread of enteric live adenovirus type 4 vaccine in married couples. *J Infect Dis* 1969; **119**: 51-9.
 50. Mueller R, Muldoon R, Jackson G. Communicability of enteric live adenovirus type 4 vaccine in families. *J Infect Dis* 1969; **119**: 60-6.
 51. Ginsberg H, Lundholm-Beauchamp U, Horswood R, et al. Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3823-7.
 52. Tacket C, Losonsky G, Lubeck M, et al. Initial safety and immunogenicity studies of an oral recombinant adenohepatitis B vaccine. *Vaccine* 1992; **10**: 673-6.
 53. Natuk R, Lubeck M, Chanda P, et al. Immunogenicity of recombinant human adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees. *AIDS Res Hum Retro* 1993; **9**: 395-404.
 54. Ragot T, Finerty S, Watkins P, Perricaudet M, Morgan A. Replication-defective recombinant adenovirus expressing the Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340/220 induces protective immunity against EBV-induced lymphomas in the cottontop tamarin. *J Gen Virol* 1993; **74**: 501-7.
 55. Eloit M, Adam M. Isogenic adenoviruses type 5 expressing or not expressing the E1A gene: efficiency as virus vectors in the vaccination of permissive and non-permissive species. *J Gen Virol* 1995; **76**: 1583-9.
 56. Rosenfeld M, Toshimura K, Trapnelli B. *In vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 1992; **68**: 143-55.
 57. Grubb B, Pickles R, Ye H, et al. Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature* 1994; **371**: 802-6.
 58. Knowles M, Hohnaker K, Zhou Z, et al. A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1995; **333**: 823-31.
 59. Yao S, Wilson J, Nabel E, Kurachi H, Hachiya H, Kurachi K. Expression of human factor IX in rat capillary endothelial cells: toward somatic gene therapy for hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8101-5.
 60. Dai Y, Roman M, Naviaux R, Verma I. Gene therapy via primary myoblasts: Long-term expression of factor IX protein following transplantation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10892-5.
 61. Armentano D, Thompson A, Darlington G, Woo S. Expression of human factor IX in rabbit hepatocytes by retrovirus-mediated gene transfer: Potential for gene therapy of hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6141-5.
 62. Stratford-Perricaudet L, Makeh I, Perricaudet M, Briand P. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest* 1992; **90**: 626-30.
 63. Bennett J, Wilson J, Sun D, Forbes B, Maguire A. Adenovirus vector-mediated *in vivo* gene transfer into adult murine retina. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1993; **35**: 2535-42.
 64. Imperiale M, Kao H, Feldman L, Nevins J, Strickland S. Common control of the heat shock gene and early adenovirus genes: Evidence for a cellular E1A-like activity. *Mol Cell Bio* 1984; **4**: 867-74.
 65. Yang Y, Ertl H, Wilson J. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1994; **1**: 433-42.
 66. Yang Y, Nunes F, Barensci K, Gonczol E, Engelhardt J, Wilson J. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* 1994; **7**: 362-9.
 67. Engelhardt J, Ye X, Doranz B, Wilson J. Ablation of E2a in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6196-200.
 68. Haddada H, Ragot T, Cordier L, Duffour M, Perricaudet M. Adenoviral interleukin-2 gene transfer into P815 tumour cells abrogates tumorigenicity and induces antitumoral immunity in mice. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 703-11.
 69. Cordier L, Duffour M, Sabourin J, et al. Complete recovery of mice from a pre-established tumour by direct intratumoral delivery of an adenovirus vector harbouring the murine IL-2 gene. *Gene Ther* 1995; **2**: 16-21.
 70. Morgan R. Retroviral vectors in human gene therapy. In: Vos J, ed. *Viruses in human gene therapy*. Durham North Carolina: Carolina Academic Press, 1995; 77-107.
 71. Meerovitch K, Sonenberg N. Internal initiation of picornavirus RNA translation. *Seminars Virol* 1993; **4**: 217-27.
 72. Miller A, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 1986; **6**: 2895-902.
 73. Hunt L, Brown D, Robinson H, Naeve C, Webster R. Retrovirus-expressed hemagglutinin protects against lethal influenza virus infections. *J Virol* 1988; **62**: 3014-19.
 74. Blaese R, Anderson W. The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther* 1990; **1**: 327-62.
 75. Blaese R, Culver K, Miller A, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 1995; **270**: 475-80.
 76. Kay M, Rothenberg S, Landen C, et al. *In vivo* gene therapy of hemophilia B: Sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* 1993; **262**: 117-19.

77. Wilson J, Chowdhury N, Grossman M, et al. Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 8437-41.
78. Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, Heard J. Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8377-81.
79. Yee J, Miyanohara A, LaPorte P, Bouic K, Burns J, Friedmann T. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: Highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9564-8.
80. Miyanohara A, Yee J, Bouic K, LaPorte P, Friedmann T. Efficient *in vivo* transduction of the neonatal mouse liver with pseudotyped retroviral vectors. *Gene Ther* 1995; **2**: 138-42.
81. Watanabe Y, Kuribayashi K, Miyatake S, et al. Exogenous expression of mouse interferon cDNA in mouse neuroblastoma C1300 cells results in reduced tumorigenicity by augmented anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 9456-60.
82. Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* 1990; **172**: 1217-24.
83. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3539-43.
84. Fakhrai H, Shawler D, Gjerset R, et al. Cytokine gene therapy with interleukin-2-transduced fibroblasts: Effects of IL-2 dose on anti-tumor immunity. *Hum Gene Ther* 1995; **6**: 591-601.
85. Samulski R. Adeno-associated viral vectors. In Vos J, ed. *Viruses in human gene therapy*. Durham, North Carolina: Carolina Academic Press, 1995: 53-76.
86. Flotte T, Afione S, Conrad, C, et al. Stable *in vivo* expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10613-17.
87. Morgan R, Anderson W. Human gene therapy. *Ann Rev Bio* 1993; **62**: 191-217.